

Aufreinigung und funktionelle Charakterisierung der peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p aus *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biophysik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt Universität zu Berlin

von
Diplom Ingenieurin Biotechnologie Gabriele Schreiber
geb. 05.03.1968 in Kirchheim unter Teck

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Pomorski

2. Prof. Dr. Andreas Herrmann

3. Prof. Dr. Markus Aebi

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2007

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aufreinigung und der funktionellen Charakterisierung der peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p und Pxa2p aus *S. cerevisiae*. ABC-Transporter sind membrangebundene Transportproteine, die eine Vielzahl von überwiegend lipophilen Substraten aktiv unter ATP Verbrauch über Membranen transportieren. Die meisten ABC-Transporter haben eine ähnliche Proteinarchitektur mit zwei Transmembrandomänen und zwei nukleotidbindenden Domänen.

Die peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p und Pxa2p sind Halbtransporter mit jeweils einer Transmembrandomäne und einer nukleotidbindenden Domäne, die miteinander fusioniert sind. Genetische Studien ergaben Hinweise, dass sie zur Bildung aktiver Transporter heterodimerisieren und am Import von langkettigen Fettsäuren in die Peroxisomen von *S. cerevisiae* beteiligt sind. Ein direkter Nachweis fehlt bisher jedoch.

In dieser Arbeit wurden erstmals epitopmarkierte Varianten der Proteine in einer einstufigen Aufreinigung als Komplex isoliert. Damit konnte gezeigt werden, dass Pxa1p und Pxa2p ein stabiles Heterodimer bilden. Zur Charakterisierung der ATP Bindeeigenschaften wurden die aufgereinigten Transporter mit 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP inkubiert und kovalent verknüpft. Dabei konnte gezeigt werden, dass Pxa1p und Pxa2p eine unsymmetrische Bindung des ATP Analogons aufweisen. Pxa2p bindet deutlich mehr 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP als Pxa1p, bei sehr ähnlichen Dissoziationskonstanten. Die reduzierte ATP Bindung von Pxa1p spiegelt sich durch degenerierte Sequenzmotive der an der ATP Bindung beteiligten Sequenzen wieder.

Die isolierten ABC-Transporter wurden für ATPase Messungen mit verschiedenen potenziellen Transportsubstraten eingesetzt. Dabei wurde gezeigt, dass die ABC-Transporter in ihrer aktiven Form aufgereinigt werden konnten. Sie zeigten eine basale ATPase Aktivität, die durch Zugabe langkettiger Coenzym A aktivierter Fettsäuren, wie Oleoyl-CoA und Palmitoyl-CoA stimulierbar war.

Weiterhin wurden Mutanten generiert, die eine Punktmutation in einem der hochkonservierten Motive enthielten, die nach den gegenwärtigen Modellvorstellungen an der ATP Bindung beteiligt sind. Eine Lysin Mutation im Walker A Motiv von Pxa1p hatte keine Funktionalitätseinbuße zur Folge. Dieselbe Mutation bei Pxa2p führte im Wachstumstest auf Festmedium mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle zu einem deutlich verlangsamten Wachstum, ähnlich der Deletionsmutante. Dieses Ergebnis korrespondiert mit der beobachteten schwächeren ATP Bindung für Pxa1p, da in dieser ATP Bindungstasche kein großer Effekt zu erwarten war. Keine Übereinstimmung war jedoch bei den ATPase Aktivitätsmessungen der aufgereinigten Mutanten zu verzeichnen. Beide Mutanten zeigten eine unbeeinträchtigte ATPase Aktivität im solubilisierten Zustand.

Die aufgereinigten ABC-Transporter wurden in Proteoliposomen eingebaut und für Transportmessungen mit einem Spin-Label (SL) markierten Oleoyl-CoA Derivat verwendet. In diesen Transportmessungen konnte ein ATP abhängiger Transport gezeigt werden. Daraus wurde geschlossen, dass Pxa1p-Pxa2p tatsächlich ATP abhängig Coenzym A Ester langkettiger Fettsäuren über Membranen transportiert und dazu *in vitro* keine weiteren Donor- oder Akzeptorproteine und andere Faktoren notwendig sind.

Schlagwörter: ABC-Transporter, Peroxisomen, Fettsäuretransport, ATPase Aktivität, SL-Oleoyl-CoA, Flippase, Rekonstitution

Abstract

This thesis addresses the purification and functional characterisation of peroxisomal ABC-transporters Pxa1p and Pxa2p from *Saccharomyces cerevisiae*. ABC-transporters are membrane bound transport proteins, responsible for the ATP dependent active transport of a huge amount of mostly lipophilic substrates across membranes. Most ABC-transporters share similar protein architecture, containing two transmembrane domains and two nucleotide binding domains.

The peroxisomal ABC-transporters Pxa1p and Pxa2p are half transporters each containing one transmembrane domain, fused with a nucleotide binding domain. Previous genetic investigations have demonstrated that Pxa1p and Pxa2p have to dimerise in order to build a functional active transporter. This in turn is very likely involved in the import of long chain fatty acids into peroxisomes of *S. cerevisiae*, but the direct evidence for the proposed functions is missing.

In this work, for the very first time, tagged versions of the proteins were purified in a one step purification procedure as a complex. This proved for the building of a stable hetero dimer. For characterisation of the ATP binding properties, the purified transporters were incubated and cross linked with 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP. This revealed an asymmetric binding of the ATP analogue. Pxa2p binds much more 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP, than Pxa1p, while the dissociation constants are rather similar. The poorer ATP binding of Pxa1p is reflected by degenerated sequence motifs in the nucleotide binding fold.

The purified ABC-transporters have been used for ATPase assays, including several potential transport substrates. The measured ATPase activity revealed that the ABC-transporters were isolated in their active state. They showed a basal ATPase activity, which could be stimulated by addition of long chain fatty acid CoAs, like oleoyl-CoA and palmitoyl-CoA.

Furthermore, mutants were cloned, which carry a mutation in the highly conserved motives, which are, according to the current model, involved in nucleotide binding. A lysine mutation in the walker A motive of Pxa1p led to no functional impairment. Meanwhile the corresponding lysine mutation in Pxa2p led to reduced growth on agar plates with oleic acid as sole carbon source, similar to the Δpxa2 knock out mutant. The result corresponds with the ATP binding properties of Pxa1p. Because of the poorer ATP binding, even in the wild type protein, the mutation was not supposed to have a big influence. However, no accordance was found in respect to the ATPase measurements of the isolated mutant proteins. Both mutants revealed unaffected ATPase activity in solubilized state.

The purified ABC-transporters were reconstituted in proteoliposomes and used for translocation assays of a spin-labelled (SL) oleoyl-CoA derivative. The measurements revealed an ATP dependent transport of the oleoyl-CoA analogue. This led to the conclusion, that Pxa1p-Pxa2p is indeed the transporter of long chain acetyl CoA esters, which were transported in an ATP dependent manner. The *in vitro* transport is independent of other donor or acceptor proteins and other co-factors.

Keywords: ABC-transporter, peroxisomes, fatty acid transport, ATPase activity, SL-Oleoyl-CoA, flippase, reconstitution

Inhalt

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Peroxisomen	1
1.1.1 Peroxisomen Biogenese	2
1.1.2 Import von peroxisomalen Proteinen	3
1.1.3 Stoffwechselfunktionen von Peroxisomen	4
1.2 ABC-Transporter	6
1.2.1 Struktur von ABC-Transportern	8
1.2.2 Die nukleotidbindende Domäne besitzt hochkonservierte Sequenzmotive	9
1.2.3 Beim Substrattransport hat die ATP Bindung eine Funktion als Schalter	11
1.2.4 ABC-Transporter von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.3 Peroxisomale ABC-Transporter	14
2 Zielstellung	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Chemikalien und Lösungen	22
3.2 Geräte	22
3.3 Biologisches Material	23
3.3.1 Hefestämme	23
3.3.2 Bakterienstämme	23
3.3.3 Plasmide	23
3.3.4 Oligonukleotide	24
3.3.5 Antiseren	24
3.4 Medien	25
3.5 Lösungen und Puffer	26
3.6 Methoden	27
3.6.1 Anreicherung von peroxisomalen Membranen	27
3.6.2 Untersuchung der Stabilität von Coenzym A aktivierten Fettsäuren	30
3.6.3 Rekonstitution peroxisomaler Membranproteine	31
3.6.4 Generierung spezifischer Antikörper gegen Pxa1p und Pxa2p	31
3.6.5 Isolierung der ABC-Halbtransporter Pxa1p-Pxa2p	32
3.6.6 Native Gelelektrophorese und ATPase Aktivitätsmessung im Gel	34
3.6.7 Untersuchung der ATP Bindung	34
3.6.8 Untersuchung der ATPase Aktivität	36
3.6.9 Synthese und Aufreinigung der SL-Fettsäure-CoA Thioester	39
3.6.10 Herstellung proteinfreier symmetrisch markierter Vesikel	41

3.6.11 ESR-spektroskopische Untersuchung der Transversalbewegung der Fettsäureanaloge in Modellmembranen.....	41
3.6.12 Rekonstitution von Pxa1p-Pxa2p in Proteoliposomen.....	43
3.6.13 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	43
3.6.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
3.6.15 Western-blotting und Immunodetektion.....	44
3.6.16 Allgemeine Methoden.....	45
4 Ergebnisse.....	46
4.1 Anreicherung peroxisomaler Membranen.....	46
4.1.1 Untersuchung der Substratstabilität potenzieller Substrate.....	47
4.1.2 Rekonstitution peroxisomaler Membranproteine.....	49
4.2 Aufreinigung von Pxa1p-Pxa2p.....	52
4.2.1 Expressionssysteme.....	52
4.2.2 Generierung spezifischer Antikörper gegen Pxa1p und Pxa2p.....	55
4.2.3 Aufreinigung der peroxisomalen ABC-Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p.....	55
4.2.4 Substratstabilität bei Inkubation mit aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p.....	59
4.2.5 Native Gelelektrophorese und ATPase Aktivität.....	60
4.2.6 Nukleotid Bindung.....	62
4.2.7 ATPase Aktivität von aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p.....	68
4.3 Transportmessungen.....	77
4.3.1 Synthese und Aufreinigung von SL-Oleoyl-Coenzym A.....	77
4.3.2 Überprüfung der biologischen Aktivität von SL-Oleoyl-CoA.....	79
4.3.3 Analyse des Einbauverhaltens in Liposomen.....	80
4.3.4 Transversale Beweglichkeit der Fettsäureanaloge in Membranen.....	81
4.3.5 Proteoliposomen.....	83
4.3.6 SL-Oleoyl-CoA Markierung von Proteoliposomen.....	84
5 Diskussion.....	88
5.1 Warum sind peroxisomale Membranen kein geeignetes Ausgangsmaterial für Acyl-CoA stimulierte ATPase Aktivitätsmessungen und Transportmessungen?.....	88
5.2 Epitopmarkierung, Überexpression und Aufreinigung von Pxa1p-Pxa2p.....	89
5.3 Charakterisierung der Nukleotidbindung von Pxa1p-Pxa2p.....	92
5.4 Unterscheidet sich die Aktivität der C-terminal epitopmarkierten Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p von den N-terminal markierten Varianten?.....	95
5.5 Welche Erklärung gibt es für die widersprüchlichen Ergebnisse der stimulierbaren ATPase Messungen?.....	96
5.6 Warum zeigten die Mutanten keine reduzierte ATPase Aktivität?.....	98
5.7 Beweisen die Transportuntersuchungen, dass Pxa1p-Pxa2p <i>in vivo</i> für den Transport langkettiger Acyl-CoA Ester verantwortlich sind?.....	99
5.8 Ausblick.....	101
Literatur.....	103
Anhang.....	108

Sequenzen	108
Homologievergleich.....	110
Danksagung	115
Publikationen.....	116
Eidesstattliche Erklärung.....	117

Wenn du ein Schiff bauen willst,
so trommle nicht Männer zusammen,
um Holz zu beschaffen,
Werkzeuge vorzubereiten,
Aufgaben zu vergeben,
und die Arbeit einzuteilen,
sondern lehre die Männer die Sehnsucht
nach dem weiten endlosen Meer.

Antoine de Saint-Exupéry

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC	ATP binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b/bp	Base(n)/Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
<i>Candida sp.</i>	<i>Candida</i> -Spezies
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Counts per minute
DDM	β-Dodecylmaltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOC	Natriumdeoxycholat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
EtOH	Ethanol
x g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
<i>H. sapiens/ Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2'-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
K 510 E	Lysin an Position 510 wurde gegen Glutaminsäure ausgetauscht
K 650 E	Lysin an Position 650 wurde gegen Glutaminsäure ausgetauscht
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MESG	Methylthioguanosin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
N-	Amino-
NaCl	Natriumchlorid

Abkürzung	Bedeutung
p	piko
p. A.	per analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P _i	freies Phosphat
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNP	Purin Nukleosid Phosphorylase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i> / Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
<i>V. cholerae</i> / Vc	<i>Vibrio cholerae</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die Grenzen einer Zelle sind durch biologische Membranen geformt, bestehend aus einer Lipiddoppelschicht mit eingebetteten Proteinen. Diese biologischen Membranen haben zum Einen eine Barrierefunktion, zum Anderen laufen dort auch wichtige biochemische Prozesse wie die Energieproduktion und –speicherung und die Informationsweiterleitung ab. Die Zusammensetzung verschiedener zellulärer Membranen bezüglich der Lipide und der Proteine ist sehr unterschiedlich und spezifisch. Die wichtigsten Bestandteile der Lipidschicht sind Phospholipide, Glycolipide und Sterole.

Einfache prokaryotische Zellen besitzen nur eine Plasmamembran, während eukaryotische Zellen zusätzliche membranbegrenzte Kompartimente enthalten, die sog. Zellorganellen wie Zellkern, Mitochondrien, Chloroplasten, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat, Lysosomen und Peroxisomen. Diese Kompartimentierung der Zelle ermöglicht es, biochemische Prozesse räumlich voneinander zu trennen und unter optimierten Bedingungen durchzuführen. Die Kompartimentierung wurde während der evolutionären Entwicklung der Eukaryonten notwendig, da sie eine bessere Regulation und Kontrolle von biochemischen Prozessen ermöglicht. Zusammen mit der Kompartimentierung mussten jedoch spezielle Transportsysteme entwickelt werden, um ausgewählte Stoffe in und durch die Membranen zu leiten, ohne die Barrierefunktion zu stören. Diese Durchlässigkeit wird durch spezielle Transportsysteme erreicht, die Moleküle in und aus den Zellen und über Organellenmembranen transportieren. In der Evolution wurden verschiedene dieser Systeme entwickelt, eins davon ist die Familie der Transportproteine mit ATP bindender Kassette (ABC-Transporter).

1.1 Peroxisomen

Als Kompartimente für den Fettsäureabbau sind während der Evolution Peroxisomen entstanden. Peroxisomen sind ubiquitär vorkommende Zellorganellen, die in allen eukaryotischen Zellen existieren. Sie kommen in variabler Größe (Durchmesser von 0,1 – 1 µm) und Anzahl vor und besitzen einen Proteingehalt, der von den Stoffwechselanforderungen der Zelle abhängt. Sie sind im Gegensatz zu Mitochondrien und Chloroplasten von einer einfachen Membran umschlossen [10, 74]. Da isolierte Peroxisomen für niedermolekulare Substanzen freidurchlässig sind, wurde lange Zeit angenommen, dass die peroxisomale Membran keine Barriere darstellt. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Peroxisomen unter *in vivo* Bedingungen geschlossene Strukturen darstellen, die für niedermolekulare Substanzen nicht freidurchlässig sind, und deshalb das Vorhandensein von Transportmechanismen voraussetzen [91].

In Säugetieren sind Peroxisomen essentielle Organellen, was deutlich wird durch schwerwiegende humane Krankheiten, die auf einer gestörten Peroxisomenbildung (Zellwegersyndrom) oder einer gestörten β -Oxidation beruhen. Bei Deletion eines der Gene, die in die Peroxisomenbildung involviert sind, konnte bei Mäusen eine massive Behinderung und eine kurze Überlebenszeit festgestellt werden. Säugerzellen in Zellkulturen sind jedoch auch mit gestörter Peroxisomenbiogenese kultivierbar. Ähnlich dazu verhalten sich Hefen: *Saccharomyces cerevisiae* mit gestörter Peroxisomenbildung oder gestörter β -Oxidation zeigt nur unter speziellen Kultivierungsbedingungen ein verzögertes Wachstum. Bei Nutzung von Zuckern oder Glycerin als Kohlenstoffquelle ist das Wachstum völlig normal, während bei Nutzung von Fettsäuren als Kohlenstoffquelle das Wachstum stark verlangsamt ist [92].

1.1.1 Peroxisomen Biogenese

Über den Mechanismus der peroxisomalen Biogenese wurde lange Zeit heftig diskutiert. Es gab verschiedene Modellvorstellungen, wobei jene Vorstellung über längere Zeit hinweg die meisten Anhänger hatte, die besagte, dass es sich bei Peroxisomen wie beim perinuklearen ER, Mitochondrien und Chloroplasten um autonom replizierende Organellen handelt, die aus der Teilung bereits vorhandener hervorgehen. Bei diesem Modell wird das Peroxisomenwachstum durch die Rekrutierung von Phospholipiden über einen unbekannten Mechanismus und durch einen posttranslationalen Proteinimport erreicht. Dies wird über peroxisomale Signalsequenzen (PTS1 und PTS2) und eine Peroxisomen spezifische Proteinimport-Maschinerie bewerkstelligt. Das Modell war sehr solide, konnte aber nicht begründen, wie Mutantenzellen nach mehreren Generationen ohne Peroxisomen neue Peroxisomen bilden konnten. [83]

Eine weitere Theorie ging davon aus, dass es einen Zusammenhang zwischen ER und Peroxisomen gibt, der aber lange Zeit diffus blieb. Neuere Ergebnisse stützen diese Theorie jedoch, so wurden in der Hefe *Yarrowia lipolytica* zwei N-glycosylierte Membranproteine gefunden, die Hinweise darauf geben, dass diese Proteine auf ihrem Weg zu den Peroxisomen das ER passieren. Außerdem wurden in dentritischen Zellen von Mäusen komplexe peroxisomale Übergangstadien gefunden, die für immuno-elektronenmikroskopische Studien verwendet wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Pex13p, ein integrales peroxisomale Membranprotein auch im ER und in lamellären Strukturen lokalisiert ist, die vom ER abstammen. PMP70, ein muriner peroxisomaler ABC-Halbtransporter, wurde ebenfalls in den lamellären Strukturen und in reifen Peroxisomen gefunden, während die Matrixenzyme Thiolase und Katalase ausschließlich in Peroxisomen gefunden wurden. Aufgrund dieser Entdeckungen wurde gefolgert, dass die Peroxisomenentwicklung aus dem ER über Lamellen geschieht [83].

Weitere Unterstützung erhielt die Abstammungstheorie der Peroxisomen aus dem ER durch zeitaufgelöste Mikroskopieverfahren. Damit konnte das Auftauchen von fluoreszenzmarkiertem Pex3p-YFP nach Induktion in *S. cerevisiae* verfolgt werden. Pex3p spielt eine essentielle Rolle bei der Peroxisomenbildung, da ohne funktionales Pex3p weder Peroxisomen noch peroxisomenähnliche Strukturen zu finden sind. Nach der Induktion konnte Pex3p-YFP zuerst im ER gefunden werden, danach konzentrierte es sich in Strukturen, die zunächst mit dem ER co-lokalisiert waren und sich später lösten und am Ende fand sich Pex3p-YFP in reifen Peroxisomen. Pex19p, ein mit Pex3p interagierendes Protein, folgt demselben Weg ab den ER co-lokalisierten Strukturen. [83]

Diese neueren Daten lieferten die Basis für die Abstammungstheorie der Peroxisomenbiogenese. Ein paar Pex Proteine besiedeln das ER und fangen Membranbereiche ein, indem sie ER Proteine verdrängen. Diese spezialisierten ER Bereiche werden vom ER Donor über einen unbekannten Mechanismus losgelöst. Sie reifen zu Stoffwechselaktiven Organellen heran. Die Kompetenz für den Import von Matrixproteinen setzt dabei erst relativ spät ein, woraus geschlossen wird, dass nach der Erstbesiedelung der Pex Proteine andere Proteine die Führung übernehmen. Erst nach dem kompletten Aufbau der Proteinimportmaschinerie durch alle Pex Proteine kann der Reifungsprozess mit dem Import der Enzyme abgeschlossen werden. Die neue Theorie beantwortet auch die bislang unbeantwortete Frage der Lipidrekrutierung für das Wachstum der Peroxisomen. Membranen gelangen direkt vom ER, wo die meisten Lipide synthetisiert werden, zu den Peroxisomen [83].

Die neue Theorie der Peroxisomenbiogenese liefert viele Antworten, wirft aber auch neue Fragen auf. So ist unklar, ob neue Peroxisomen durch Teilung oder durch Membranfusion entstehen, wie die erstbesiedelnden Pex Proteine ins ER gelangen, obwohl keine gemeinsamen Signalsequenzen gefunden wurden, und wie ER Proteine

ausgeschlossen werden [83]. In diesem Zusammenhang werden auch cermidreiche Lipid-Raft Domänen diskutiert, die für den Ausschluss von ER Proteinen verantwortlich sein könnten [9].

1.1.2 Import von peroxisomalen Proteinen

Im Gegensatz zu Chloroplasten, Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum, bei denen ungefaltete Polypeptide in die Organellen transportiert werden, können bei Peroxisomen Proteine in einem gefalteten und sogar oligomeren Zustand über die peroxisomale Membran transportiert werden. Der posttranslationale Import peroxisomaler Matrix- und Membranproteine erfordert 25 – 30 Gene. Der Import der Matrixproteine hängt von zwei peroxisomalen Signalsequenzen PTS1 und PTS2 (peroxisomal targeting signal), zwei zytosolischen Rezeptoren (Pex5p und Pex7p), sowie mindestens zehn membrangebundenen Proteinen ab, die den Import der gefalteten Matrixproteine katalysieren [74].

Der Import von peroxisomalen Matrixproteinen ist relativ gut aufgeklärt, peroxisomale Matrixproteine werden im Zytosol an freien Ribosomen translatiert und vollständig gefaltet. Der Import in die Peroxisomen erfordert eine der Signalsequenzen PTS1 oder PTS2. Die Signalsequenz PTS1 besteht aus einem kurzen Tripeptid am C-Terminus des Proteins, die Konsensussequenz ist (S/A/C)(K/R/H)(L/M), wobei (S/K/L) die häufigste Kombination ist. Die zweite Signalsequenz PTS2 besteht aus einem Nonapeptid, das in der Nähe des N-Terminus lokalisiert ist, üblicherweise innerhalb der ersten 20 Aminosäuren. Die Konsensussequenz ist (R/K)(L/V/I)X₅(H/Q)(L/A). Die Signalsequenz PTS2 wird nur für ganz wenige Proteine wie z.B. die 3-Ketoacyl-CoA Thiolase verwendet, während die meisten anderen peroxisomalen Matrixproteine PTS1 verwenden. Bei der Acyl-CoA Oxidase Fox1p in *S. cerevisiae* wurde keine der beiden Signalsequenzen gefunden, sie bildet dennoch einen Rezeptor-Cargo Komplex mit Pex5p, so dass möglicherweise noch weitere Signalsequenzen existieren. Die Signalsequenzen blieben über die Artgrenzen hinweg konserviert, bei Nematoden ist der PTS2 Importweg jedoch komplett verschwunden [10]. PTS1 bindet den zytosolischen Rezeptor Pex5p, während Proteine mit der Signalsequenz PTS2 den zytosolischen Rezeptor Pex7p binden. Der beladene Rezeptor-Cargo Komplex bindet an den membrangebundenen Dockingkomplex (Pex13p, Pex14p und Pex17p). Nach dem erweiterten „Shuttle-Modell“, kommt es nach dem Import des Rezeptor-Cargo Komplexes in die Peroxisomenmatrix zur Dissoziation. Der Rezeptor wird anschließend wieder ins Zytosol exportiert und steht für eine neue Runde zur Verfügung. Der re-Export der Rezeptoren geschieht über einen noch nicht vollständig aufgeklärten ATP abhängigen Mechanismus [5].

Über den Import peroxisomaler Membranproteinen (PMPs) ist deutlich weniger bekannt. Der Import der PMPs verläuft über einen anderen Mechanismus und ist unabhängig vom Import der Matrixproteine. Es wurde gezeigt, dass leere Geisterperoxisomen korrekt gefaltete PMPs enthalten können. Die PMP Importmaschinerie benötigt die Peroxine Pex3p, Pex19p und Pex16p, wobei die Funktion von Pex16p ist nicht besonders konserviert ist, da es in den meisten Hefen nicht vorkommt [26]. Pex19p scheint eine doppelte Funktion zu erfüllen. Im Zytosol fungiert es als „Chaperon“ (Faltungshilfsprotein) für PMPs und an den Peroxisomen als Importrezeptor. Dies erfüllt Pex19p, indem es an Pex3p andockt. Pex3p ist das einzige PMP mit einem Pex19p unabhängigem Einbau in die Membran, wo es als Anker für Pex19p fungiert [10, 74]. Die Aufgabe von Pex16p ist möglicherweise die Bildung eines Grundgerüsts für die Rekrutierung der PMP Importmaschinerie [26].

Die Signalsequenzen der PMPs für den Einbau in die peroxisomale Membran, die sogenannten mPTS, enthalten zwei funktional verschiedene Domänen. Eine Zielsequenz, die das PMP zur peroxisomalen Membran dirigiert

(teilweise Pex19p Signalsequenz) und eine Ankersequenz, die für den permanenten Einbau in die Membran notwendig ist. Die bisher identifizierten mPTSs unterscheiden sich stark und sind durch Sequenzanalysen nicht identifizierbar. Allen mPTSs gemeinsam ist, dass sie nach dem Einbau im Protein verbleiben und nicht proteolytisch herausgeschnitten werden und dass sie aus einem Cluster von basischen Aminosäuren bestehen, gefolgt von mindestens einem Transmembransegment. Die bisher identifizierten mPTSs sind von sehr unterschiedlicher Länge, die mPTS von Sc Pxa1p ist zwischen den Aminosäuren 71 – 168 lokalisiert, bei Hs PMP69 zwischen AS 16 – 133, bei Hs PMP70 gibt es zwei Fragmente (AS 1 - 61 und 61 - 138), ebenso für Hs ALDP (AS 1 - 110 und 67 - 164) [87].

Aufgrund der großen Variabilität der mPTSs war es schwierig eine Konsensussequenz für die Pex19p Bindung zu ermitteln. Rottensteiner *et al.* schlugen basierend auf der systematischen Analyse von PMPs aus *S. cerevisiae* ein α -helicales Motiv mit der Konsensussequenz $(x_3)\text{--}[\text{CFILTVW}]\text{--}(x_2)\text{--}[\text{ACFILQVWY}]\text{--}[\text{CILV}]\text{--}(x_2)\text{--}[\text{ACFILVWY}]\text{--}[\text{ILQRV}]\text{--}(x_3)$ vor [69]. Diese Sequenz ist tatsächlich in der Lage, Pex19p Bindungsstellen in PMPs von Menschen, Hefen und *Trypanosoma brucei* zu identifizieren, sie führt jedoch auch zu vielen falsch positiven Funden. Die Entdeckung, dass viele PMPs mit mehreren membrandurchspannenden Segmenten mehrere mPTSs haben, weist darauf hin, dass dies von biologischer Relevanz sein könnte. Es wurde vorgeschlagen, dass mehrere Signalsequenzen in Kooperation sicherstellen, dass es zu einem effizienten Einbau in die peroxisomale Membran kommt. Multiple mPTSs könnten mehrere Pex19p binden und so das neu translatierte Protein im Zytosol durch die Abschirmung hydrophober Regionen stabilisieren [87].

Da PMPs generell sehr hydrophob sind, muss bereits während der Translation im Zytosol die Aggregation verhindert werden. Dies geschieht wahrscheinlich durch lösliche Faktoren, die an die PMPs binden und sie weiterreichen an den Apparat, der PMPs in die peroxisomale Membran einbaut [87].

Die Hefegenomdatenbank (<http://db.yeastgenome.org>), enthält 19 Einträge für integrale peroxisomale Membranproteine (Stand Mai 2007). Dies sind Pex2p, Pex3p, Pex10p, Pex11p, Pex12p, Pex13p, Pex14p, Pex15p, Pex17p, Pex22p, Pex28p, Pex29p, Pex30p, Pex31p, Pex32p, Inp2p, Ant1p, Pxa1p und Pxa2p. Die integralen peroxisomalen Membranproteine kommen, bei nativer Expression, nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Ausnahmen sind Pex11p und Ant1p [54]. Pex11p hat eine Funktion beim Wachstum und der Teilung von Peroxisomen und ist möglicherweise am Import bzw. der Aktivierung mittelkettiger Fettsäuren beteiligt und bei Ant1p handelt es sich um den peroxisomalen Adenin Transporter, der für den Import von ATP und den Export von AMP zuständig ist [56]. Neben Pxa1p-Pxa2p hat kein anderes integrales peroxisomales Membranproteine eine bekannte ATP hydrolysierende Aktivität. Nur für die membranassoziierten Proteine Pex1p und Pex6p wird eine ATP abhängige Funktion beim re-Export von Pex5p vermutet [5].

1.1.3 Stoffwechselfunktionen von Peroxisomen

Peroxisomen sind in allen Spezies an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt. Darüber hinaus haben sie bei Säugetieren noch weitere Funktionen wie die Synthese von Ether-Phospholipiden und Gallensäuren, die α -Oxidation von verzweigten Fettsäuren und der Abbau von Purinen, Polyaminen, L-Pipecolinsäure und D-Aminosäuren [90]. In Hefen und Pflanzen findet die β -Oxidation von Fettsäuren ausschließlich in Peroxisomen statt, während bei höheren Eukaryonten die β -Oxidation arbeitsteilig zwischen Mitochondrien und Peroxisomen abläuft. Überlangkettige Fettsäuren (VLCFAs; $>\text{C}_{22:0}$), werden in Peroxisomen gekürzt, und zusammen mit den

mittel- und langkettigen Fettsäuren in Mitochondrien bis zum Acetyl-CoA abgebaut [32, 91]. In humanen Peroxisomen werden neben VLCFAs, Pristansäure, Di- und Trihydroxycholestansäure (DHCA und THCA) und Tetracosanhexansäure (C24:6) abgebaut. Die β -Oxidationsenzyme von Mitochondrien und Peroxisomen sind unterschiedlich, obwohl die β -Oxidation in beiden Organellen sehr ähnlich abläuft. Der wichtigste Unterschied ist der erste Schritt bei der Umwandlung der Acyl-CoAs zu trans-2-enoyl-CoAs. Dieser Schritt ist in Mitochondrien durch eine Acyl-CoA Dehydrogenase und in Peroxisomen durch eine Acyl-CoA Oxidase katalysiert [92]. In Abb. 1 sind die Reaktionsschritte der peroxisomalen β -Oxidation skizziert.

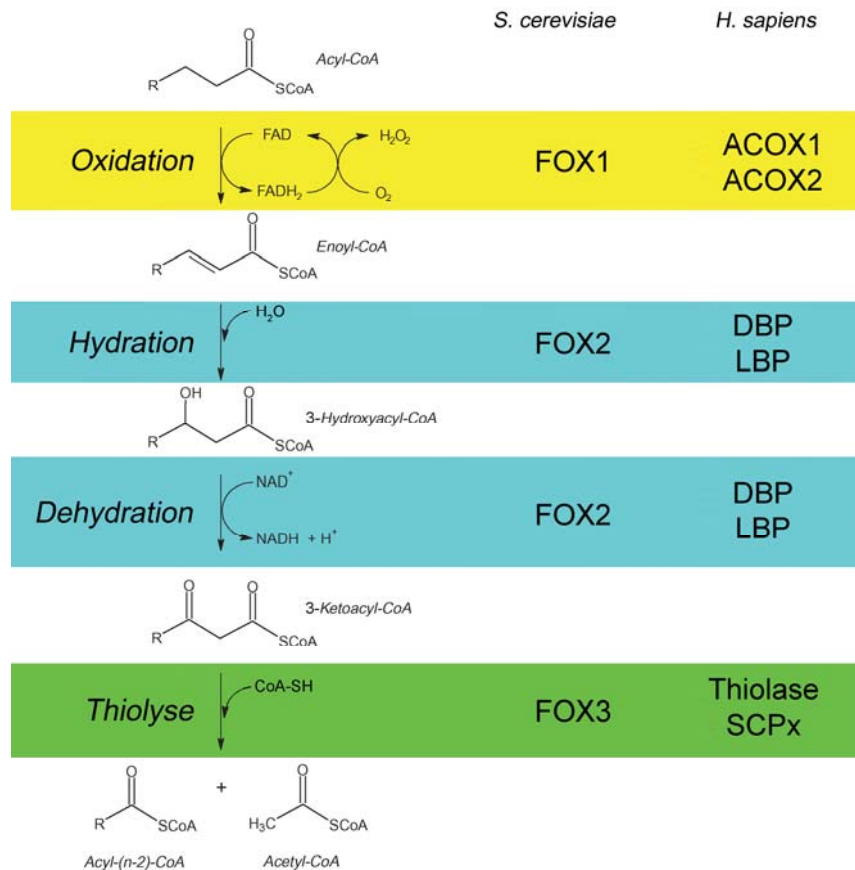


Abb. 1: Peroxisomale β -Oxidation in *Homo sapiens* und *Saccharomyces cerevisiae*. Die vier Reaktionsschritte eines β -Oxidationszyklus, die zur Abspaltung einer Acetyl-CoA Einheit führen, mit den dafür verantwortlichen Enzymen sind skizziert. Enzyme: ACOX, Acyl-CoA Oxidase; DBP, D-bifunktionales Enzym; FOX1, Acyl-CoA Oxidase; FOX2, bifunktionales Enzym; FOX3, 3-ketoacyl-CoA Thiolase; LBP, L-bifunktionales Enzym; SCPx, Sterol Carrier Protein (modifiziert nach Visser *et al.* [90]).

Die peroxisomale β -Oxidation ist ein zyklischer Prozess, der dazu dient Fettsäuren in Acetyl-CoA Einheiten zu zerlegen, die dann in den Mitochondrien zur Energiegewinnung genutzt werden. Die Fettsäuren werden in jedem Zyklus am Carboxyl-Ende um zwei Kohlenstoffatome gekürzt, um ein Acetyl-CoA zu gewinnen. Ein β -Oxidationszyklus in Peroxisomen besteht aus vier Reaktionsschritten, die in *S. cerevisiae* von drei Proteinen durchgeführt werden. Bei höheren Eukaryonten einschließlich dem Menschen und Pflanzen werden diese Reaktionsschritte durch multiple Enzyme durchgeführt. Trotzdem sind die vier Reaktionsschritte, wie in Abb. 1 skizziert, die gleichen [90]. Der erste Reaktionsschritt wird beim Menschen von zwei verschiedenen CoA Oxidasen mit teilweise unterschiedlicher Substratspezifität durchgeführt. ACOX1 (Palmitoyl-CoA Oxidase) katalysiert die

Oxidation von CoA aktivierten Prostaglandinen und Fremdstoffen, während ACOX2 (Cholestanoyl-CoA Oxidase) eine Spezifität für verzweigte Fettsäuren, DHCA und THCA besitzt. Beide CoA Oxidasen katalysieren die Oxidation von CoA Estern unverzweigter Fettsäuren und Dicarbonsäuren sowie langkettiger Fettsäuren. Der zweite und dritte Schritt der β -Oxidation wird von bifunktionalen Enzymen durchgeführt. Beim Menschen wird die Hydratation und Dehydratation wiederum von zwei Enzymen durchgeführt. Das D- und L-bifunktionale Protein (DBP und LBP) bildet und dehydriert D- bzw. L-3-Hydroxyacyl-CoA. Wobei DBP den überwiegenden Anteil der Substrate umsetzt. Humane Peroxisomen besitzen ebenfalls zwei Thiolasen, die 3-Oxoacyl-CoA Thiolase für unverzweigte Fettsäuren und die Sterol Carrier Protein-2/3-Oxoacyl-CoA Thiolase (SCPx) für 2-Methyl verzweigte Fettsäuren, Pristansäure, DHCA und THCA [91].

Die bei der β -Oxidation entstehenden Acetyl-CoA Einheiten müssen die Peroxisomen verlassen, um in den Mitochondrien weiter abgebaut zu werden, oder im Zytosol anderen Prozessen zur Verfügung zu stehen. Sie können die peroxisomale Membran nicht spontan überqueren und benötigen Transportsysteme. In *S. cerevisiae* gibt es wahrscheinlich drei verschiedene Exportwege: i) die Umwandlung von Acetyl-CoA durch die Carnitin-Acyltransferase Cat2p und den Export als Carnitinester durch ein bisher unbekanntes Protein, ii) die Einschleusung in den Glyoxylatzzyklus durch die peroxisomale Citratsynthase Cit2p die Acetyl-CoA und Oxalacetat in Citrat umwandelt, wobei am Ende Succinat entsteht, das durch einen ebenfalls unbekannten Mechanismus entlassen wird und iii) die Hydrolyse von Acetyl-CoA in Acetat und CoASH mit nachfolgendem Export von Acetat [88, 90].

Da bei höheren Eukaryonten der Glyoxylatzzyklus nicht existiert, gibt es für Fettsäuren und Acetyl-CoA hier nur zwei Exportwege aus den Peroxisomen, einen Carnitin abhängigen Weg und einen Thioesterase abhängigen Weg. Acyl-Carnitine werden wahrscheinlich über einen Acyl-Carnitin/Carnitin Transporter, ähnlich dem in Mitochondrien transportiert [91]. Verschiedene peroxisomale Thioesterasen spalten Acyl-CoAs in CoASH und freie Fettsäuren, die die Peroxisomen über einen bislang ungeklärten Mechanismus verlassen [90].

Zum weiteren Abbau in den Mitochondrien gelangen kurz- und mittelkettige Fettsäuren als freie Fettsäuren in ihrer protonierten Form durch Diffusion in die Mitochondrien, während langkettige Fettsäuren über den Carnitinzyklus importiert werden [91].

1.2 ABC-Transporter

Mitglieder der Protein Superfamilie mit ATP bindender Kassette (ABC-Proteine) finden sich in den meisten Spezies, wobei sie eine der größten bisher beschriebenen Proteinfamilien repräsentiert. Sie besteht aus einer großen Anzahl von Transportern, Kanälen und regulatorischen Proteinen in Pro- und Eukaryonten. Ihre Funktion reicht von der Aufnahme von Nährstoffen über die Ausschleusung von Abfallstoffen bis zur Regulation verschiedener zellulärer Prozesse. Membrangebundene ABC-Proteine werden auch ABC-Transporter genannt, es handelt sich dabei um Transmembranproteine, die den spezifischen aktiven Transport von Substraten wie Aminosäuren, Zucker, Ionen, Peptide, Proteine, Lipide und einer Vielzahl von organischen und anorganischen Molekülen über Biomembranen vermitteln. Viele der Substrate besitzen lipophilen Charakter [76]. Generell verfügen ABC Proteine über eine geringe Transportkapazität, weisen jedoch eine hohe Substrataffinität auf und sind in der Lage gegen einen 10 000-fachen Konzentrationsgradienten zu transportieren [57]. Die für den Transport benötigte Energie wird aus der ATP Hydrolyse gewonnen. ABC-Transporter haben eine festgelegte Transportrichtung.

Eukaryotische Transporter sind Exporter, während bei Prokaryonten auch Importer existieren sowie ein paar ganz seltene Ausnahmen für bidirektionale Transporter [38].

Die grundlegende ABC-Transporter Architektur besteht aus vier Domänen, die unterschiedlich angeordnet sein können. Zwei paarweise angeordnete Transmembrandomänen (TMDs) mit meist sechs α -Helices, die den Transportweg bilden, und zwei nukleotidbindenden Domänen (NBDs). NBDs und TMDs können als getrennte Proteine vorkommen oder miteinander fusioniert sein, wie in Abb. 2 schematisch gezeigt wird. Einige Motive der NBDs sind hochkonserviert, während die Transmembrandomänen kaum Sequenzhomologie (aber Strukturhomologie) aufweisen. Es wird vermutet, dass die TMDs zusammen mit den verbindenden Loops für die Substratspezifität verantwortlich sind, was durch die geringe Sequenzhomologie reflektiert wird [57].

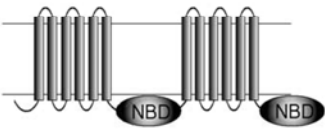
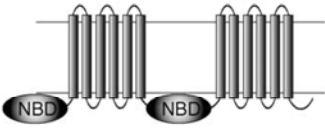
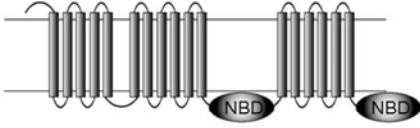
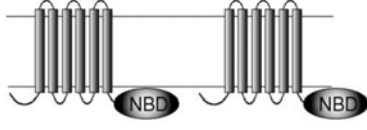
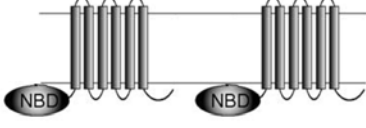
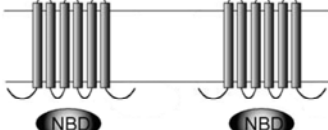
Domänenorganisation	Domänen	Beispiele
	$(\text{TMD-NBD})_2$	MDR1
	$(\text{NBD-TMD})_2$	PDR
	$\text{TMD}_0(\text{TMD-NBD})_2$	MRP1
	$\text{TMD-NBD} \times 2$	ALDP
	$\text{NBD-TMD} \times 2$	BCRP1
	$\text{NBD} \times 2$ $\text{TMD} \times 2$	HisP

Abb. 2: Die wichtigsten Domänenorganisationen von ABC-Transportern. Transmembrandomänen (TMDs) sind als membrandurchspannende Helices gezeigt. TMDs und nukleotidbindende Domänen (NBDs) bilden zusammen den ABC-Volltransporter. Abhängig von der Organisation können Volltransporter aus einem Protein ($(\text{TMD-NBD})_2$, $(\text{NBD-TMD})_2$, $\text{TMD}_0(\text{TMD-NBD})_2$), aus einem Homo- oder Heterodimer ($\text{TMD-NBD} \times 2$, $\text{TMD-NBD} \times 2$) oder einem Tetramer ($\text{NBD} \times 2$, $\text{TMD} \times 2$) bestehen (modifiziert nach Jungwirth *et al.* [40]).

Die Anordnung der NBDs und TMDs in den aktiven Volltransportern kann, wie in Abb. 2 skizziert ist, sehr unterschiedlich sein. Die TMDs und die NBDs können Homo- und Heterodimere bilden. Die Domänen können in jeder Kombination angeordnet sein, z.B. als separate Polypeptide wie im Falle einiger bakterieller Transporter, als Volltransporter in einem kompletten Polypeptid wie die Mehrzahl der eukaryotischen ABC-Transporter oder sie sind als Halbtransporter arrangiert und bestehen aus einer TMD fusioniert mit einer NBD. Darüber hinaus wurden verschiedene weitere weniger häufige Arrangements gefunden.

1.2.1 Struktur von ABC-Transportern

ABC-Transporter sind ATP hydrolysierende Enzyme (ATPasen). Sie interagieren mit zwei unterschiedlichen Substrattypen: einem energieliefernden Substrat und einem Transportsubstrat. Das energieliefernde Substrat ist der intrazelluläre MgATP Komplex. Die chemische Energie für den aktiven Transport von Substraten wird durch die Bindung und Hydrolyse von ATP in den NBDs zur Verfügung gestellt und über die intrazellulären Loops (ICLs) an die Transportsubstratbindenden TMDs übertragen [72].

Bislang stehen neben ein paar isolierten nukleotidbindenden Domänen nur drei hochauflösende Strukturdaten prokaryotischer Volltransporter zur Verfügung. Dies sind der Vitamin B12 Transporter BtuCD aus *E coli*, der Metallchelator Transporter HI1470/1 aus *Haemophilus influenzae* und der Arzneimittelexporter Sav1866 aus *Staphylococcus aureus*.

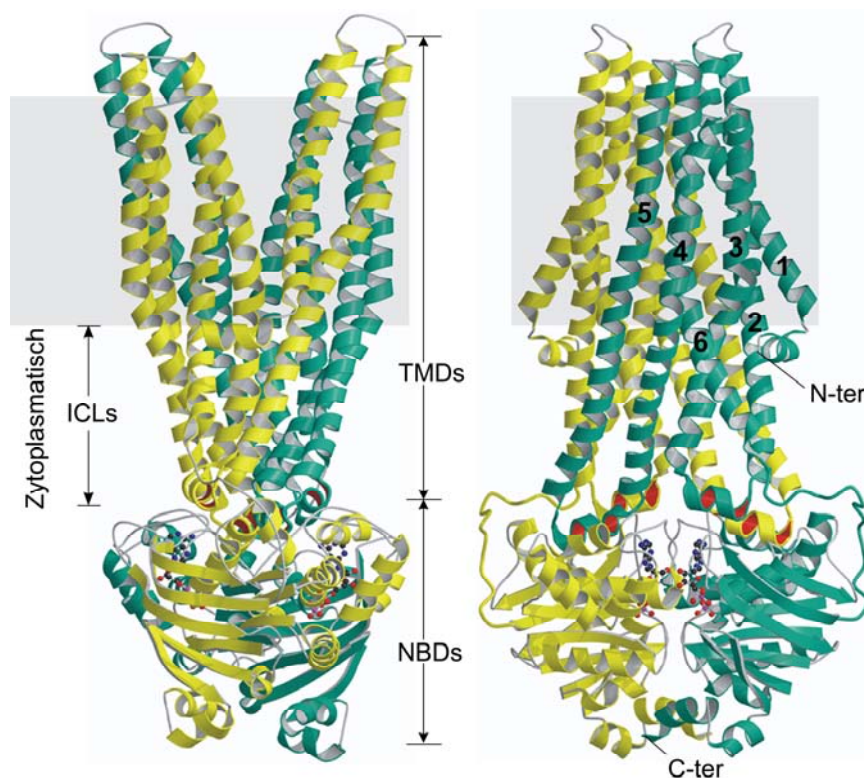


Abb. 3: Sav1866 Struktur. Die Struktur zeigt den homodimeren ABC-Transporter Sav1866 in geschlossener Konformation mit den beiden Monomeren in gelber und türkiser Farbe. Das gebundene ADP ist als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die beiden Modelle zeigen Sav1866 jeweils um 90° gedreht, die graue Schattierung symbolisiert die Phospholipidmembran, in die die Transmembrandomänen (TMDs) eingelagert sind, die intrazellulären Loops (ICLs) verbinden die TMDs mit den nukleotidbindenden Domänen (NBDs). Die TMDs eines Monomers sind nummeriert und die Lokalisation des N- und des C-Terminus ist markiert. Die rot markierten α -Helices repräsentieren interagierende Motive zwischen den NBDs und den TMDs (Abbildung modifiziert nach Dawson *et al.* [17]).

Der bakterielle ABC-Transporter Sav1866 ist ein Homodimer und zeigt Homologien zu humanen ABC-Transportern aus der B Subfamilie wie ABCB1 (MRP1/P-gp) und ABCB2/B3 (TAP1/2). In Abb. 3 ist die hochauflösende Kristallstruktur mit 3,0Å von Sav1866 abgebildet. Der bakterielle ABC-Transporter Sav1866 ist in der Lage, Krebsmedikamente wie Doxorubicin und Vinblastin zu transportieren, diese Medikamente sind auch Transportsubstrate des multiplen Arzneimittelresistenz-Transporters ABCB1. Die Sav1866 Monomere besitzen eine TMD, die die Membran mit sechs α -Helices durchquert. Die TMD ist mit der NBD fusioniert, die für die Nukleotidbindung und Hydrolyse zuständig ist. Das TMD-TMD Dimer ist gegenüber dem NBD-NBD Dimer rotiert, so dass jede TMD an beide NBDs grenzt. Die Mechanismen, die dazu führen, dass die Energie, die aus der ATP Bindung und Hydrolyse gewonnen wird, auf die TMDs übertragen wird ist noch weitgehend ungeklärt, unter anderem deshalb, weil es noch keine Kristallstrukturen in Anwesenheit von Transportsubstraten gibt. Alle Modellmechanismen beruhen auf einer Kombination von computergestützten Vorhersagemethoden, biochemischen Daten und Strukturdaten hoch aufgelöster prokaryotischer ABC-Transporter [34, 48].

1.2.2 Die nukleotidbindende Domäne besitzt hochkonservierte Sequenzmotive

In den NBDs der ABC-Transporter gibt es hochkonservierte Sequenzmotive mit funktionaler Bedeutung, die die Vermutung zulassen, dass ABC-Transporter über einen gemeinsamen Mechanismus verfügen, die ATP Hydrolyse mit dem Substrattransport zu koppeln, obwohl das genaue Verständnis für diese Prozesse noch fehlt [17]. In Abb. 4 ist die Kristallstruktur des NBD Dimers von Haemolysin B (HlyB), einem bakteriellen ABC-Transporter aus *E. coli* mit den markierten konservierten Sequenzmotiven in Anwesenheit von ATP abgebildet.

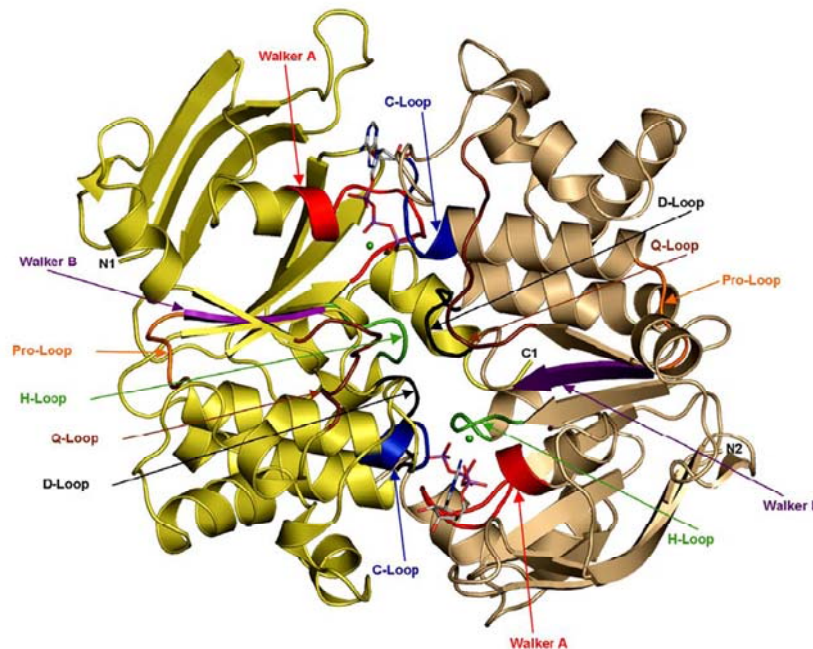


Abb. 4: Kristallstruktur einer dimeren NBD von HlyB mit ATP in geschlossener Konformation. Die Monomere sind gelb und beige markiert, hochkonservierte Sequenzmotive sind, wie der Abbildung zu entnehmen, farblich markiert. Zwei ATP Moleküle, als rot und pinkfarbene Stabmodelle skizziert, sind zwischen den Monomeren eingeklemmt. Mg^{2+} ist als grüne Kugeln gezeigt (Struktur aus Schmitt *et al.* 2003 [75]).

Als wichtigste konservierte Motive gibt es eine glycinreiche Sequenz (Walker A Motiv), ein konserviertes Glutamin (Q-Loop), die spezifische ABC-Signatur (L-S-G-G-Q), das Walker B Motiv und ein konserviertes Histidin (H-Loop). Die ABC-Signatur ist das Kennzeichen für ABC-Proteine, da sie nur dort vorkommt. Die Sequenz der peroxisomalen ABC-Signatur weicht etwas von der Konsensussequenz ab (L-S-G-G-E) (siehe Abb. 47). Die Walker A und B Motive treten auch in anderen ATP hydrolysierenden Proteinen auf [72].

Es wurden die Strukturen verschiedener isolierter pro- und eukaryotischer NBDs publiziert, wie z.B. *E. coli* HisP, MalK und HlyB sowie humanes CFTR und TAP1. Alle publizierten Strukturen wiesen bemerkenswerte Ähnlichkeit auf. Die Monomere besitzen eine L-Form mit zwei Armen, die in einer Kopf zu Schwanz Orientierung angeordnet sind. Der hochkonservierte Arm I beinhaltet das Walker A und B Motiv sowie die H- und Q-Loops, während der Arm II hauptsächlich α -Helices und eine wenig konservierte Region von ca. 30 Aminosäuren enthält, von der man vermutet, dass sie die Verbindung zwischen den NBDs und den TMDs herstellt. Die zwei NBDs ergänzen gegenseitig die aktiven Domänen und formen zwei zusammengesetzte katalytische Zentren. Die Walker A und Walker B Domäne einer Untereinheit und die ABC-Signatur der gegenüberliegenden Einheit sind an der Bildung der zusammengesetzten ATP-bindenden/katalytischen Taschen beteiligt, wie in Abb. 5 schematisch gezeigt ist [72, 75].

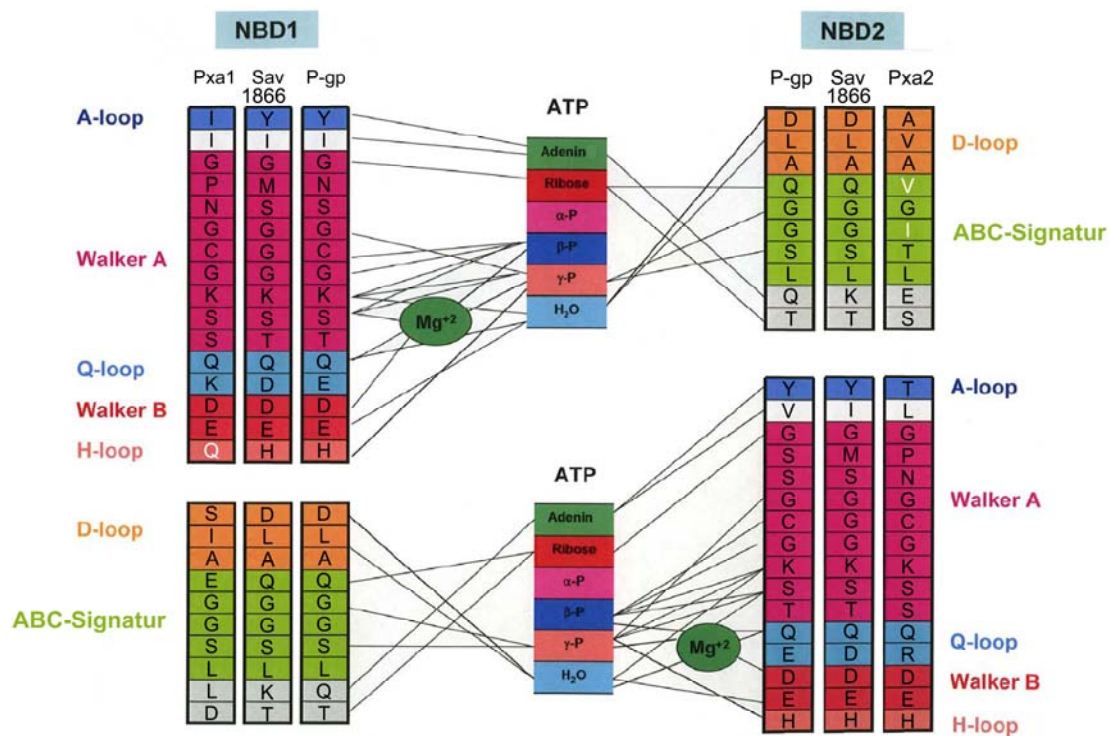


Abb. 5: Konservierte Sequenzmotive des Volltransporters P-gp (ABCB1), des Homodimers Sav1866 und des Heterodimers Pxa1p-Pxa2p, die an der Bindung von Mg-ATP beteiligt sind. Die Abbildung beruht auf Vergleichen von P-gp mit prokaryotischen Kristallstrukturen, Homologievergleichen und Mutationsanalysen von P-gp. Es sind die Aminosäuren gezeigt, die mit ATP interagieren. Wichtige degenerierte Sequenzen von Pxa1p und Pxa2p sind weiß markiert (modifiziert nach Ambudkar *et al.* [2]).

Basierend auf den Strukturdaten und Sequenzvergleichen wurde ein detaillierter molekularer Mechanismus entwickelt. Bei der ATP-Bindung koordinieren die Spezies der Walker A Domäne in der NBD-I die drei Phosphatgruppen von ATP, während der Adeninring durch Interaktionen mit einer benachbarten sperrigen Gruppe orientiert wird. In derselben NBD wechselwirken das Q-Loop und das Walker B Glutamat (E) abwechselnd mit einem Wassermolekül, dass an der ATP Hydrolyse beteiligt ist. Von der NBD-II werden Spezies der ABC-Signatur an der Koordination der Phosphatgruppen und dem Ribose Teil des ATPs beteiligt, während ein zusätzliches Alanin (A) mit dem katalytischen Wassermolekül wechselwirkt. Während der ATP Hydrolyse, die in einer Veränderung von einem „prehydrolysierten“-Zustand zu einer Mg-ADP bindenden „posthydrolytischen“ Struktur führt, kommt es zusammen mit mehreren kleineren intramolekularen Umlagerungen zu großen Bewegungen des Q-Loops und der ABC-Signatur. Die Bewegung der ABC-Signatur (LSGGQ) wird ausgelöst durch eine Rotation der ABC-spezifischen α -Subdomäne. Wechselwirkungen zwischen der ABC-Signatur und dem γ -Phosphat geben dem nukleotidbindenden Dimer zusätzliche Stabilität. ATP kann als ein „molekularer Klebstoff“ betrachtet werden, das mit dem γ -Phosphat die Walker A und Walker B Motiv und das Q-Loop der einen NBD mit dem ABC-Signatur-Motiv der gegenüberliegenden NBD verbindet. Nach der Hydrolyse bleibt ADP am Walker A Motiv und das abgespaltene Phosphat an der ABC-Signatur gebunden [72].

1.2.3 Beim Substrattransport hat die ATP Bindung eine Funktion als Schalter

Umfassende biochemische und pharmakologische Studien über den humanen „multi-Arzneimittelresistenz-Transporter“ P-gp (ABCB1) führten zu einem Modell des ATP katalysierten Transportzyklus, das möglicherweise Gültigkeit für eine größere Gruppe der ABC-Transporter hat. Dieses sogenannte ATP-Schalter Modell (ATP „switch“ Modell) beschreibt im Wesentlichen zwei Zustände mit unterschiedlichen Affinitäten für das Transportsubstrat. Diese Zustände mit hoher und niedriger Affinität sind mit einer Öffnung des Transporters auf unterschiedlichen Seiten der Membran verbunden. Das ATP-Schalter Modell beschreibt eine Verbindung dieser Zustände mit der ATP Bindung und Hydrolyse auf eine Weise, die mit den Strukturdaten in Übereinstimmung zu bringen ist [34, 48]. In Abb. 6 ist das ATP-Schalter Modell skizziert.

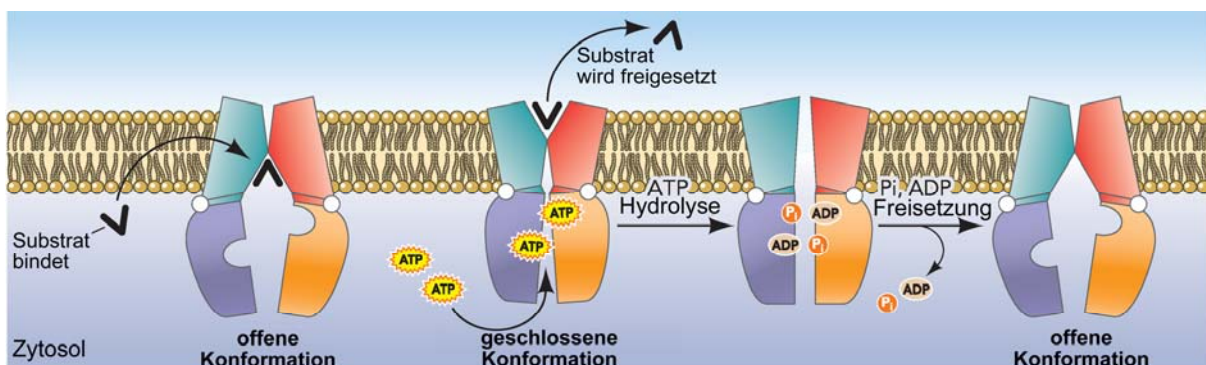


Abb. 6: ATP-Schalter Modell für die Funktion von ABC-Transportern. Die Substratbindung an eine Tasche mit hoher Affinität innerhalb der TMDs induziert eine Konformationsänderung in den NBDs, die in einer höheren Affinität für ATP resultiert. Zwei ATP Moleküle binden an die NBD. Die freigesetzte Energie bei der Bildung des geschlossenen NBD-Dimers verursacht eine Konformationsänderung der TMDs und die Freisetzung des Substrates. Die ATP Hydrolyse, als Konsequenz der Bildung des geschlossenen NBD-Dimers, verursacht die Auflösung des NBD-Dimers und damit eine weitere Konformationsänderung der TMDs. Am Ende des Zyklus werden Phosphat und anschließend ADP freigesetzt. Dies stellt die offene NBD-Dimer Konformation wieder her, bereit für den nächsten Zyklus (modifiziert nach Linton [48]).

Das ATP-Schalter Modell in Abb. 6 beinhaltet eine wiederholte Kommunikation in beide Richtungen zwischen den NBDs und den TMDs. Die Antriebskraft für den Substrattransport ist dabei ein Umschalten zwischen zwei prinzipiellen Konformationen des NBD Dimers. Die ATP Bindung induziert eine starre Rotation von Domänen innerhalb der beiden NBDs und die Bildung des geschlossenen Dimers, mit zwei eingeschlossenen ATP Molekülen an der Grenzfläche der NBDs (Sandwich Modell). Die ATP Hydrolyse und die Freisetzung von P_i /ADP lässt den Transporter wieder in seine Ausgangskonformation zurückkehren. Die enge Nähe der zwei NBDs in Kristallstrukturen intakter ABC-Transporter, gibt Hinweise auf eher geringfügige Strukturunterschiede, zwischen der offenen und der geschlossenen NBD Dimer Konformation. Es scheint daher, dass es bei der offenen Konformation zu keiner kompletten Dimer Dissoziation kommt. Die Kinetik des Umschaltens kann sich zwischen den ABC-Transportern unterscheiden, abhängig vom Zusammenspiel der beiden Nukleotidbindetaschen und den Signalen von den TMDs. In den TMDs verursacht die ATP Bindung in den NBDs eine große Konformationsänderung mit einer Änderung der Substrataffinität und der Öffnungsrichtung, die für den Substrattransport verantwortlich ist [34].

Beim ATP-Schalter Modell wird angenommen, dass im geschlossenen NBD Dimer zwei ATP Moleküle binden. Dies wurde in den Kristallstrukturen von verschiedenen bakteriellen Transportern beobachtet und für Sc Mdl1p und P-gp biochemisch nachgewiesen. Beim unsymmetrisch bindenden Chloridkanal CFTR (ABCC7), wurde indirekt nachgewiesen, dass für die Öffnung des Kanals zwei ATP Moleküle gebunden sein müssen. Trotzdem ist eine Variation des Modells denkbar, bei der ein gebundenes ATP ausreicht um das NBD Dimer zu stabilisieren [35].

Weit weniger klar ist die Situation bei der ATP Hydrolyse. Bei den meisten ABC-Transportern haben beide ATP Bindungstaschen die Kapazität ATP zu hydrolysieren und sie scheinen dies abwechselnd zu tun. Für den Transport ist dies jedoch nicht notwendig, so wurde in Mutationsstudien bei P-gp gezeigt, dass die Mutation einer Bindungstasche die ATP Hydrolyse in der anderen Tasche nicht verhindert und der Transport erhalten bleibt. In Übereinstimmung damit scheint CFTR in einem Zyklus nur ein ATP Molekül zu hydrolysieren [35].

Bei P-gp scheinen beide Bindungstaschen primär dieselbe Affinität für ATP zu haben und abwechselnd ATP zu hydrolysieren. Wie die Wahl der hydrolysierenden Bindungstaschen zustande kommt, ob sie zufällig ist oder ob das Protein sich merken kann, welche Tasche zuletzt hydrolysiert hat, ist ungeklärt, möglicherweise bleibt das ADP in der Tasche gebunden. Im Gegensatz dazu gibt es ABC-Transporter mit einer klaren Bindungsasymmetrie, bei denen die ATP Hydrolyse nur in einer Tasche stattfindet (MRP1/ABCC1), und ABC-Transporter, bei denen die Hydrolysegeschwindigkeit der beiden Bindungstaschen sehr unterschiedlich ist (Sc Mdl1) [35].

Unabhängig von der symmetrischen oder unsymmetrischen Hydrolyse, der Effekt scheint derselbe zu sein. Nach der Hydrolyse und der Nukleotidfreisetzung wird das Dimer destabilisiert und der Ausgangszustand wieder hergestellt. Am wahrscheinlichsten unterliegt die ATP Bindung und Hydrolyse einem kooperativen Mechanismus, bei der die Bindung in einer Tasche die Bindung der anderen erleichtert. Unterschiede dabei reflektieren die große Variabilität von ABC-Transportern und ihrer kinetischen Kontrolle unterschiedlicher zellulärer Prozesse [35].

Das früher favorisierte „Power stroke“ Modell unterscheidet sich vom ATP-Schalter Modell hauptsächlich dadurch, dass der Energiestoß nicht aus der ATP Hydrolyse, sondern aus der ATP Bindung resultiert, und dass der alternierenden ATP Bindung der beiden Bindungstaschen unterschiedlichen Schritten des Transportzyklusses

zugeordnet wurden, was jedoch schwer mit einer unsymmetrischen ATP Bindung in Einklang zu bringen war [35].

ABC-Transporter zeigen auch eine basale ATP Hydrolyse, ohne Substrat zu transportieren. Diese vom Transport entkoppelte zelluläre „Energievergeudung“ wird mit einer ständigen Bereitschaft zum Transport erklärt. Um die Chancen des erfolgreichen Transports auch von neuen Komponenten und von gering konzentrierten Substraten zu maximieren, läuft sich der Transporter schon „im Leerlauf“ warm. In Anwesenheit von Substraten kommt die entkoppelte, basale ATP Hydrolyse zum Erliegen und der ATP Verbrauch wird nur für den Transport verwendet [72].

1.2.4 ABC-Transporter von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt verschiedene ABC-Transporter, die Homologie zu ABC-Transportern von Säugetieren aufweisen. Darunter sind auch ABC-Transporter mit medizinischer Relevanz, weshalb die Aufklärung molekularer Mechanismen, der Substrat Interaktion und der dreidimensionalen Struktur von ABC-Transportern aus *S. cerevisiae* beim Verständnis von humanen ABC-Transportern und den verursachten Krankheiten helfen können. In Abb. 7 sind die wichtigsten ABC-Transporter von *S. cerevisiae* und ihrer Lokalisation skizziert.

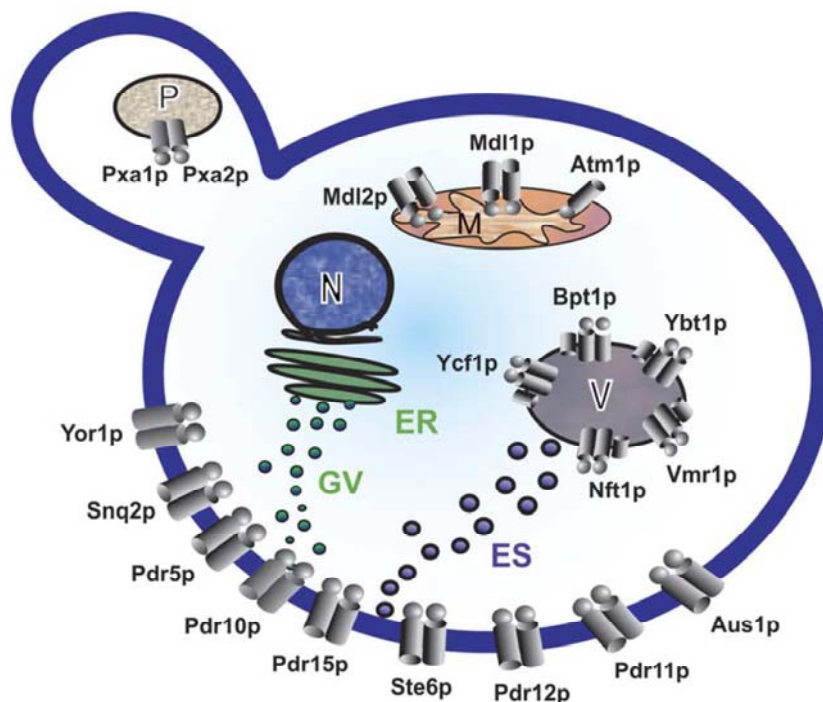


Abb. 7: Membranlokalisation von ABC-Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Wichtige ABC-Transporter mit ihrer Lokalisation in der Plasmamembran, der Vakuole (V), den Mitochondrien (M) und Peroxisomen (P) sind abgebildet (aus Jungwirth *et al.* [40]).

Die ABC-Transporter der Hefe sind entweder Volltransporter mit zwei fusionierten TMDs und NBDs in einer Peptidkette oder sie sind Halbtransporter, die Homo- oder Heterodimere bilden. Viele ABC-Transporter der Hefe sind funktionell und strukturell direkte Homologe von humanen ABC-Transportern [40].

Hefezellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt um Giftstoffe effizient zu bekämpfen. Daran beteiligt sind vor allem ABC-Transporter aus der PDR Gruppe (pleiotropic drug resistance). Diese Gruppe, die in der Plasmamembran von *S. cerevisiae* lokalisiert ist, fungiert sowohl als Exporter von exogenen Arzneimitteln und Schadstoffen, als auch von endogenen toxischen Stoffwechselprodukten. Andere ABC-Transporter in der Plasmamembran sind am Transport von Phospholipiden und Sterolen sowie Pheromonen beteiligt. Die ABC-Transporter der Vakuole haben ebenfalls, soweit bekannt, Entgiftungsfunktion. Die ABC-Transporter in der inneren Mitochondrienmembran sorgen wahrscheinlich für den Transport von Eisen-Schwefelproteinen und Peptiden aus den Mitochondrien. Beim ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p in Peroxisomen wird eine Beteiligung beim Transport von Fettsäuren vermutet [40].

1.3 Peroxisomale ABC-Transporter

Die peroxisomalen ABC-Transporter des Menschen und der Hefe sind Halbtransporter, während der homologe pflanzliche Transporter von *Arabidopsis thaliana* ein Volltransporter ist [85]. Der Mensch besitzt vier homologe ABC-Transporter, die in der D Subfamilie zu finden sind: ABCD1 (ALDP; Adrenoleukodystrophie Protein), ABCD2 (ALDR; ALD „related“ Protein), ABCD3 (PMP70; peroxisomales Membranprotein mit 70 kDa) und ABCD4 (PMP69; peroxisomales Membranprotein mit 69 kDa). Die drei homologen Proteine haben 63, 33, bzw. 25% Aminosäureidentität zu ALDP [82]. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt im Gegensatz dazu nur zwei peroxisomale ABC-Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p, die wahrscheinlich miteinander dimerisieren, um einen aktiven Volltransporter zu bilden [77].

Abb. 8 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum peroxisomaler ABC-Transporter, der den Verwandtschaftsgrad peroxisomaler ABC-Transporter verschiedener Spezies skizziert.

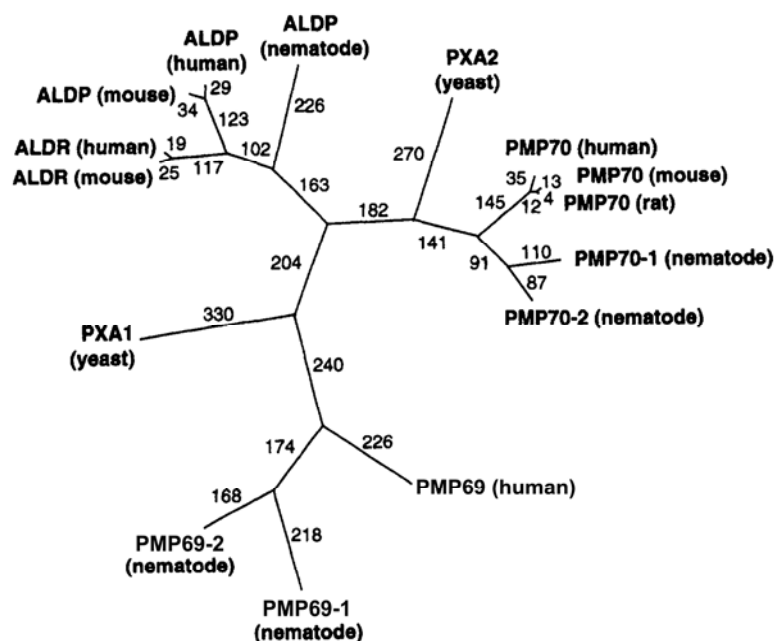


Abb. 8: Phylogenetischer Stammbaum peroxisomaler ABC-Transporter von Mensch, Maus, Ratte, Nematode und Hefe. Die Zahlen an den Zweigen geben die Zweiglänge entsprechend dem verwendeten Parsimony Algorithmus an (modifiziert nach Smith *et al.* [82])

Der phylogenetische Stammbaum in Abb. 8 zeigt die evolutionären Beziehungen der vier humanen peroxisomalen ABC-Transporter mit anderen Säugern, Nematoden und der Hefe. Der Stammbaum weist drei Hauptzweige auf. Der erste Zweig besteht aus den ALDP und ALDR Proteinen, ein zweiter Zweig besteht aus PMP70 und Pxa2 der Hefe und ein dritter Zweig beinhaltet PMP69 und zwei Homologe der Nematode. Pxa1 gehört zu keinem der Zweige, bei der paarweisen Analyse weist es ~26% Aminosäureübereinstimmung mit PMP69 und 30 - 34% Identität mit dem ALDP/ALDR Zweig auf [82].

Mutationen des humanen ABC-Transporters ABCD1 (ALDP) sind für die Stoffwechselkrankheit „X-chromosomale Adrenoleukodystrophie“ (X-ALD) verantwortlich. X-ALD ist die häufigste auf einer peroxisomalen Störung beruhende Krankheit. Sie ist X-chromosomal vererbbar und tritt mit einer Häufigkeit von 1:16800 in der Gesamtbevölkerung auf [8]. Die primäre Folge der Krankheit ist eine Akkumulation unverzweigter, überlangkettiger Fettsäuren, den sogenannten VLCFAs (very long chain fatty acids; C22:0 – C26:0). Diese VLCFAs sind überwiegend keine Nahrungsbestandteile, sondern endogenen Ursprungs.

Am schwersten betroffen von X-ALD sind Jungen im Alter von 2 bis 10 Jahren, sie können schwere neurologische Schäden mit Demyelinisierung der Nervenbahnen im Gehirn und einer Niereninsuffizienz entwickeln, die häufig sehr früh zum Tode führt. Es gibt bei X-ALD jedoch keine generelle Korrelation zwischen dem Mutationsstyp und dem klinischen Krankheitsbild. Es wurden auch schon Mutationen gefunden, wie große Deletionen, die ein komplettes Fehlen von ALDP bedingen. Das Fehlen des Proteins führte dennoch zu sehr unterschiedlichen Phänotypen, bis zu einem Fehlen von Symptomen oder einem sehr spät einsetzenden Krankheitsbeginn. Trotz der X-chromosomalen Vererbung entwickeln mindestens die Hälfte der heterozygoten Frauen ein X-ALD ähnliches Syndrom, wenn auch in milderer Ausprägung [8, 91].

Die vier humanen peroxisomalen ABC-Halbtransporter werden von verschiedenen Genen kodiert und mit sehr unterschiedlichen Expressionsraten exprimiert. Die Expression unterscheidet sich in den verschiedenen Geweben, so ist ALDP beim Menschen besonders stark in Lunge und Hoden exprimiert, ALDR im Gehirn und Milz, PMP70 in den Hoden und PMP69 in Lunge, Hoden und Milz. Nur Mutationen in ALDP führen zu X-ALD mit einer Anreicherung von überlangkettigen Fettsäuren. Die physiologische Funktion der anderen drei ABC-Transporter ist weitgehend unbekannt. Bei ALDR wurde gezeigt, dass es bei Überexpression in humanen X-ALD Zellen und in *Abcd1* (-/-) Mäusen zu einer Normalisierung des VLCFA Niveaus kommt, woraus eine teilweise überlappende Substratspezifität mit ALDP abgeleitet wurde. Überraschenderweise wurde der gleiche Effekt jedoch auch durch die Überexpression einer VLACS („very long chain“ Acyl-CoA Synthetase) erzielt [8, 82, 90]. Bei PMP70 wurde ursprünglich eine Beteiligung bei der Peroxisomenbiogenese angenommen, die aber mittlerweile revidiert ist [18]. Neuere Studien mit einer Überexpression in CHO-Zellen weisen auf eine Transportfunktion langkettiger Fettsäuren (Palmitinsäure). Zur Funktion von PMP69 gibt es keinerlei Literaturhinweise [92].

Eine weitere ungeklärte Frage ist, ob ALDP nativ als Homodimer oder als Heterodimer mit einem speziellen Partner existiert oder ob es unterschiedliche, zelltypspezifische Heterodimere mit allen möglichen Partnern bildet. Dabei ist jedoch bedeutsam, dass die vier peroxisomalen ABC-Halbtransporter ganz unterschiedliche Expressionsmuster in den verschiedenen Geweben haben, wobei die meisten Zelltypen wahrscheinlich mindestens zwei verschiedene Halbtransporter exprimieren [8, 92]. Die Frage, ob ALDP Homo- oder Heterodimere bildet,

ist von großer Bedeutung, da die Anzahl möglicher Substrate massiv ansteigen würde, wenn alle möglichen Kombinationen zwischen den Halbtransportern auftreten würden [8].

Experimentelle Untersuchungen führten zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen. Im „Yeast two-hybrid“ System wurde Homo- und Heterodimerisierung gezeigt [49], ebenso bei der Immunoprecipitation aus Rattenleberperoxisomen, bei der sowohl die Bildung von ALDP und PMP70 Homodimeren, als auch von ALDP/PMP70 Heterodimeren gezeigt wurde [84], während bei einer anderen Studie mit Mäuseleberperoxisomen ausschließlich Homodimere von ALDP und PMP70 gefunden wurden [28].

Ebenso ungeklärt wie die Frage der Dimerisierung ist die Funktion der humanen Peroxisomalen ABC-Transporter. Am besten untersucht ist ALDP, man glaubt, dass ALDP am Import von überlangkettigen Fettsäure-CoA Ester ($>C:22$) in die Peroxisomen in einer ähnlichen Weise beteiligt ist, wie Pxa1p-Pxa2p in *S. cerevisiae*. Bei ALDR nimmt man an, dass es ähnliche Funktion hat mit überschneidender Substratspezifität wie ALDP, zum einen weil die ALDR Überexpression und Induktion den ALDP Defekt teilweise aufheben kann und zum anderen weil ALDR defiziente Mäuse ähnliche Phänotypen wie ALDP defiziente Mäuse zeigen, wenn auch weniger ausgeprägt. Die Funktion von PMP70 scheint etwas mit dem Transport der Gallensäurevorstufen THCA (Trihydroxycholestansäure) und DHCA (Dihydroxycholestansäure) zu tun zu haben, da diese Stoffe von PMP70 defizienten Mäusen angereichert werden. Zur Funktion von PMP69 gibt es noch keine Hinweise [90, 92].

Die vermutete Funktion von ALDP als Transporter Coenzym A aktivierter überlangkettiger Fettsäuren basiert vor allem darauf, dass der initiale Abbau von VLCFAs in der peroxisomalen Matrix durchgeführt wird, und dass in X-ALD Fibroblasten die peroxisomale β -Oxidation nur ca. 30% des normalen Niveaus beträgt, woraus eine Akkumulation von VLCFAs resultiert. Außerdem legt die hohe Homologie zwischen den humanen peroxisomalen ABC-Transportern und denen der Hefe (siehe Abb. 8 und Homologievergleich im Anhang), deren Beteiligung am Transport CoA aktivierter Fettsäuren unzweifelhaft ist, eine ähnliche Funktion nahe [8, 91].

Es gibt jedoch auch einige Autoren, die die Beteiligung der humanen peroxisomalen ABC-Transporter am Transport überlangkettiger Fettsäuren oder CoA Ester grundsätzlich bezweifeln, und deren Ergebnisse auf einen abweichenden oder komplexeren Mechanismus weisen. So wurde für eine VLCFA Synthetase, ein Enzym, das Fettsäuren in Säugetieren verlängert, eine intraperoxisomale Lokalisation gefunden [36]. Andererseits wurde in den Geweben von Säugetieren, die bei X-ALD hauptsächlich VLCFAs akkumulieren wie Gehirn und Nebennierenrinde, bisher keine Acyl-CoA Synthetase mit einer peroxisomalen Lokalisation entdeckt [8]. Andere Quellen beschreiben jedoch, dass die VLACS (very long chain acyl CoA synthetase) bei der Akkumulation von VLCFAs keine Rolle spielt und dass die Aktivierung der VLCFAs außerhalb der Peroxisomen stattfindet. Es wurden etliche Acyl-CoA Synthetasen entdeckt, welche davon jedoch für die Aktivierung der überlangkettigen Fettsäuren verantwortlich ist, ist noch unklar [92]. Weiterhin konnte in verschiedenen X-ALD Geweben von Mäusen gezeigt werden, dass die β -Oxidation unverändert ist, obwohl VLCFAs akkumuliert wurden. Dieser Befund stand im Gegensatz zu Untersuchungen an X-ALD Fibroblasten, bei denen auch eine Störung der β -Oxidation gefunden wurde, weshalb die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass es Unterschiede zwischen Geweben und Fibroblasten gibt. Gestützt wird die Theorie, dass die Regulation der peroxisomalen β -Oxidation unabhängig von der Akkumulation VLCFAs ist, durch ein Mausmodell, bei dem die VLCFA-Acyl-CoA Synthetase fehlt. Dort wurde eine 50% reduzierte peroxisomale β -Oxidation gefunden, jedoch keine akkumulierten VLCFAs [31]. Ein weiterer Hinweis dafür, dass die Regulation der peroxisomalen β -Oxidation unabhängig von der Akkumulation

VLCFAs sein könnte, liegt in der Entdeckung, dass in X-ALD Fibroblasten und in Fibroblasten mit einer gestörten Peroxisomenbildung eine verstärkte Fettsäure-Acylkettenverlängerung gefunden wurde. Diese Untersuchungen führten zu der Spekulation, dass eine unreguliert Acylkettenverlängerung aus einer gestörten β -Oxidation zusammen mit stromaufwärts liegenden zusätzlichen Effekten resultieren könnte [8].

Wegen der widersprüchlichen Ergebnisse und der komplexeren Stoffwechselwege in Säugetieren und Säugetierzellkulturen bietet sich *S. cerevisiae* als Modellsystem für die Erforschung von Peroxisomen und des Imports von Fettsäuren an. Obwohl ABC-Transporter generell nur geringe Homologien in den Transmembrandomänen aufweisen, zeigen die peroxisomalen ABC-Transporter des Menschen und der Hefe auch dort homologe Bereiche, wie speziell das EAA-ähnliche Motiv, das ursprünglich bei bakteriellen ABC-Transportern gefunden wurde. Das EAA-ähnliche Motiv ist zwischen der vierten und der fünften Transmembranhelix lokalisiert (siehe Anhang Homologievergleich). Bei X-ALD Patienten wurden dort besonders viele Mutationen entdeckt und es wurde spekuliert, dass das EAA-ähnliche Motiv an der Kommunikation zwischen den TMDs und den NBDs beteiligt ist [35]. Analog konnte Pxa1p aus *S. cerevisiae* durch gezieltes Einfügen von Mutationen im EAA-ähnlichen Motiv inaktiviert werden, wodurch sich ein weiteres Indiz für die funktionale Verwandtschaft ergibt [78, 79].

Neben der Eigenschaft, dass die β -Oxidation ausschließlich in Peroxisomen stattfindet, bietet *S. cerevisiae* weitere Vorteile wie die einfache Kultivierbarkeit und die Fähigkeit, Fettsäuren als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Mutanten mit einfachen und doppelten *pxa1Δ* und *pxa2Δ* Deletionen, sind nicht mehr in der Lage in Medien, mit langkettigen Fettsäuren (LCFAs) wie Ölsäure (C18:1) als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, während das Wachstum mit mittelkettigen Fettsäuren (MCFAs) wie Laurylsäure (C12:0) als Kohlenstoffquelle unbeeinträchtigt bleibt. Aus dieser Beobachtung wurde geschlossen, dass Pxa1p und Pxa2p eine spezifische Rolle bei der β -Oxidation von LCFAs haben [78]. Diese Hypothese wurde gestützt durch die Entdeckung, dass MCFAs als freie Fettsäuren in die Peroxisomen gelangen, wo sie durch die Acyl-CoA Synthetase Faa2p aktiviert werden [33]. Im Gegensatz dazu werden LCFAs im Zytosol aktiviert und die LCFA-CoA Ester müssen über die peroxisomale Membran transportiert werden. Für diesen Transport wurde eine Beteiligung von Pxa1p-Pxa2p angenommen. Diese Beteiligung wurde durch ein weiteres Experiment gestützt, bei dem die Faa2p ins Zytosol umgeleitet wurde. Damit wurde die β -Oxidation von MCFAs ebenfalls Pxa1p-Pxa2p abhängig [33]. Eine Mehrfachmutante, mit Deletion von *pxa1Δ* oder *pxa2Δ* und Umleitung von Faa2p ins Zytosol, konnte weder mittelkettige noch langkettige Fettsäuren nutzen [92]. In Abb. 9 Teil (A) sind die beiden postulierten Importwege graphisch dargestellt, und in Teil (B) die β -Oxidationsaktivität verschiedener *S. cerevisiae* Mutanten bei Zugabe von Fettsäuren mit unterschiedlichen Acylkettenlängen.

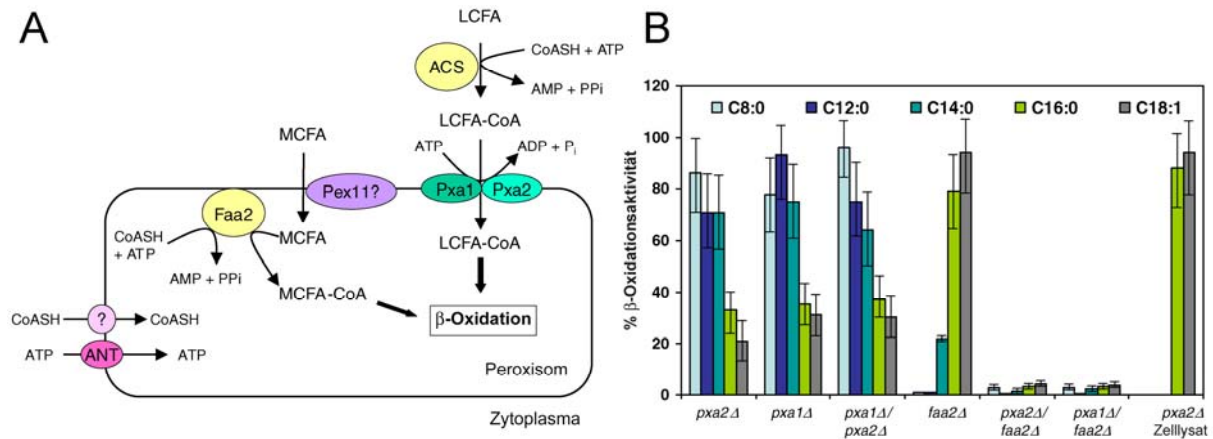
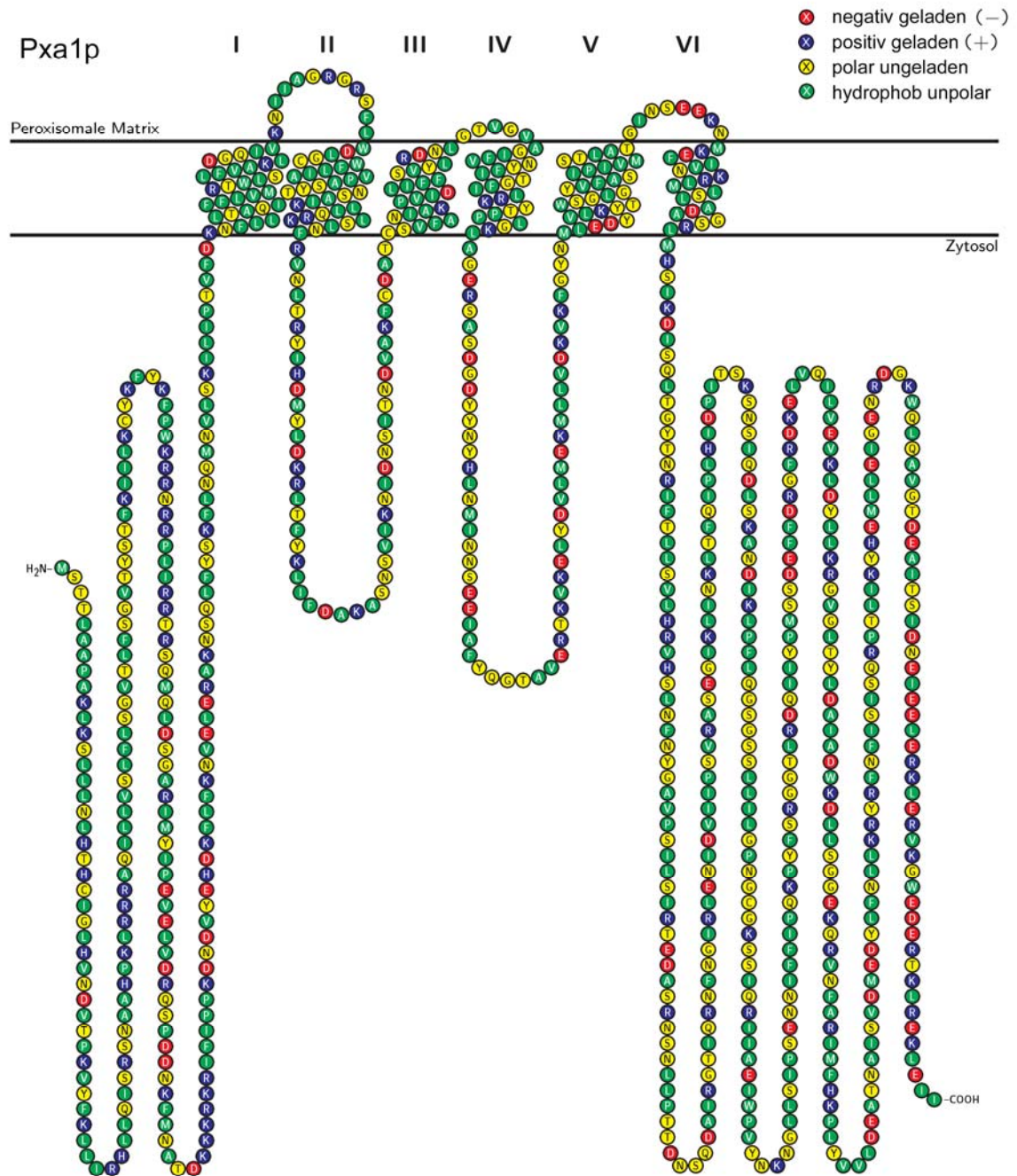


Abb. 9 Teil (A) Modell des peroxisomalen Fettsäureimport in *S. cerevisiae*. Langkettige Fettsäuren (LCFA) werden im Zytoplasma durch die Acyl-CoA Synthetase (ACS) aktiviert. LCFA-CoA Ester werden wahrscheinlich durch das Pxa1p-Pxa2p Heterodimer importiert. Im Gegensatz dazu werden mittelkettige Fettsäuren (MCFA) unabhängig von Pxa1p-Pxa2p in die Peroxisomen importiert, wo sie durch die Acyl-CoA Synthetase Faa2p aktiviert werden. Faa2p benötigt CoA und ATP, die durch Ant1p und einen bisher nicht charakterisierten CoA Transporter (?) in die Peroxisomen importiert werden. Das Peroxin Pex11 spielt möglicherweise eine Rolle beim Import von MCFA, obwohl es selbst kein Fettsäuretransporter ist (aus Teodoulou *et al.* [85]). Teil (B) Fettsäure β -Oxidation verschiedener *S. cerevisiae* Mutantenstämme. Die β -Oxidationsaktivität der unter Ölsäureinduktion kultivierten Mutantenstämme bei Zugabe von [$1\text{-}^{14}\text{C}$] markierten Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge wurde in Relation zum Wildtypstamm angegeben (aus Wanders *et al.* [92]).

Das Modell in Abb. 9 Teil (A) scheint den Import von fast allen Fettsäuren in die Peroxisomen schlüssig zu beschreiben, trotzdem gibt es ein paar publizierte Ergebnisse, die nicht in das Modell zu passen scheinen. Bei *Arabidopsis thaliana* wurde eine Abhängigkeit der peroxisomalen β -Oxidation vom ABC-Volltransporter PXA1 und zwei peroxisomalen Acyl-CoA Synthetasen (LACS6 und LACS7) gefunden. Es wurde eine gestörte β -Oxidation beim Fehlen von PXA1 und beim Fehlen beider Acyl-CoA Synthetasen verzeichnet. Eine Deletion nur einer Acyl-CoA Synthetase blieb ohne erkennbaren Phänotyp. Diese Ergebnisse wurden so interpretiert, dass es bei *Arabidopsis thaliana* keine unabhängigen Importwege gibt, sondern dass PXA1 mit den peroxisomalen Acyl-CoA Synthetasen zusammenarbeitet. Das Modell sieht eine konzertierte Aktion des ABC-Transporters mit den Acyl-CoA Synthetasen vor, bei dem PXA1 eine Coenzym A aktivierte Fettsäure über die Peroxisomale Membran transportiert und eine freie Fettsäure ins Innere entlässt, wo sie durch eine der Acyl-CoA Synthetasen re-aktiviert werden muss. *Arabidopsis thaliana* weist im Vergleich zu allen anderen bekannten peroxisomalen ABC-Transportern eine abweichende Proteinarchitektur auf und kodiert für einen 150 kDa ABC-Volltransporter (PXA1 oder CTS), dessen Hälften jeweils eine Aminosäureübereinstimmung mit ALDP von 35% haben [85]. Aufgrund der abweichenden Struktur bei Pflanzen, ist es jedoch fraglich, ob die Situation bei *A. thaliana*, für andere peroxisomale ABC-Transporter, repräsentativ ist [90].

Trotz der guten biochemischen und genetischen Charakterisierung von Pxa1p-Pxa2p aus *S. cerevisiae*, wurde die Funktion auch dieser ABC-Transporter bisher nicht definitiv nachgewiesen. Der Nachweis durch funktionelle Rekonstitution als Homo- oder Heterodimer in Proteoliposomen mit nachfolgenden Transportstudien steht noch aus [92].

Die homologen peroxisomalen ABC-Transporter von Hefe und Säugetieren haben die gleiche Halbtransporterarchitektur mit einer N-terminalen Transmembrandomäne mit sechs postulierten α -Helices, die die Membran durchspannen und einer C-terminalen nukleotidbindenden Domäne [79]. Abb. 10 zeigt die Proteinsequenz von Pxa1p und Pxa2p mit der postulierten Topologie der α -Helices, die die Membran durchqueren.



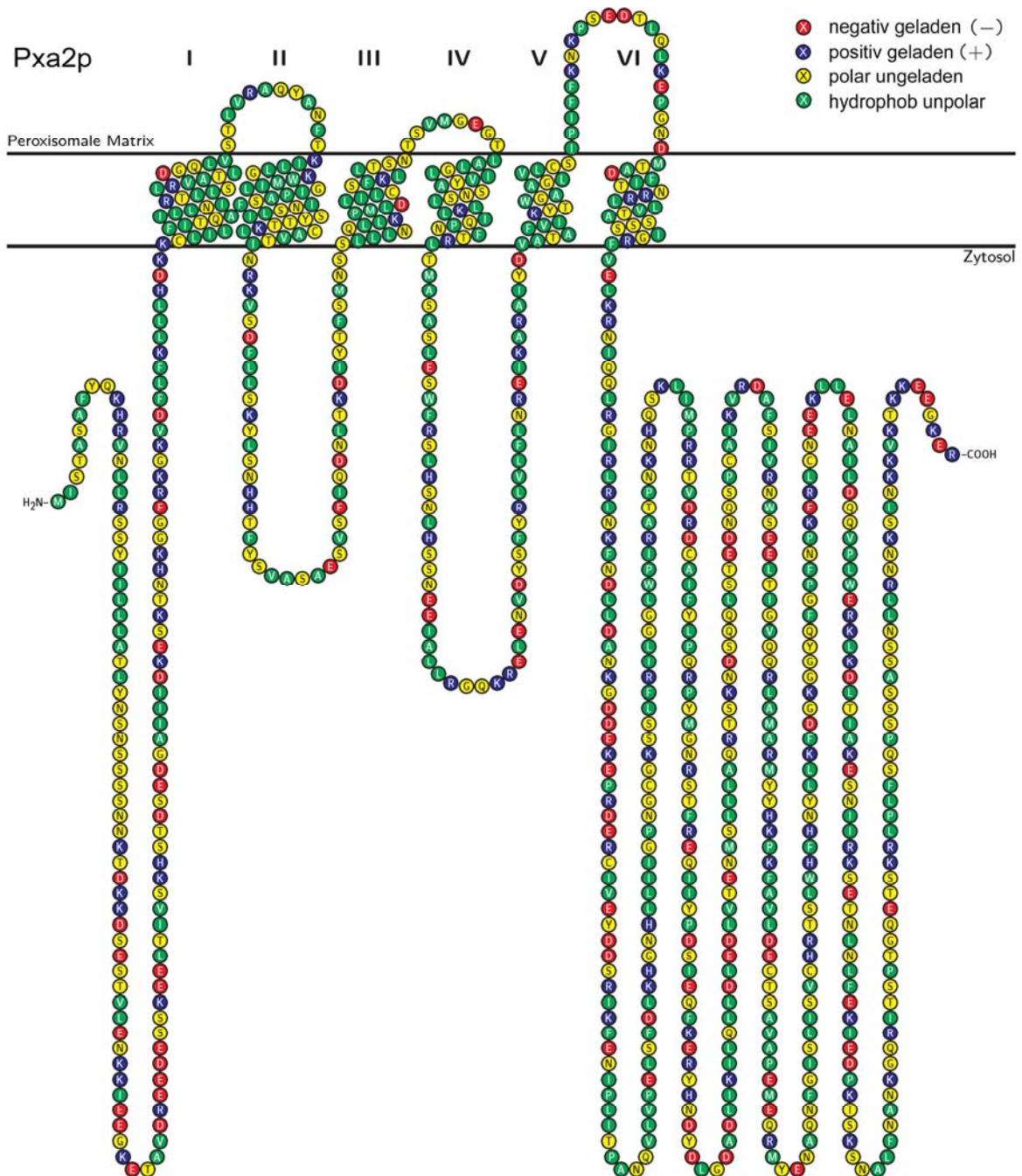


Abb. 10: Topologiemodell der sechs postulierten Transmembrandomänen von Pxa1p und Pxa2p. Die Farbmarkierung entspricht, wie in der Legende gekennzeichnet, der Polarität der Aminosäuren. Grün markiert sind hydrophobe, unpolare Aminosäuren, die sich besonders gehäuft in den postulierten Transmembrandomänen finden. Rot und blau markiert sind negativ und positiv geladene Aminosäuren, die besonders häufig in den C-terminalen Bereichen zu finden sind, die die nukleotidbindende Domäne bilden. Die Modelle wurden mit dem LaTeX Makropaket TEXtopo generiert [6].

Die Topologiemodelle von Pxa1p und Pxa2p in Abb. 10 basieren auf Literaturdaten [79, 98] und einem Homologievergleich (siehe Anhang). Es zeigt die Transmembrandomänen mit sechs postulierten α -Helices. Die Aminosäuren sind entsprechend ihrer Polarität und Ladung farblich markiert (siehe Legende). In den Sequenzmotiven, die innerhalb der Membran lokalisiert sind, finden sich besonders viele hydrophob unpolare und polar ungeladene Aminosäuren, während sich in den C-terminalen Sequenzen, die die nukleotidbindenden Domänen bilden, besonders viele geladene Aminosäuren befinden. Die Funktion der N-terminalen zytosolischen Motive von Pxa1p und Pxa2p ist unbekannt.

2 Zielstellung

Biochemische und genetische Untersuchungen der peroxisomalen ABC-Transporter von *S. cerevisiae* haben Hinweise geliefert, dass Pxa1p-Pxa2p für den Transport langkettiger Fettsäure-CoA Ester über die peroxisomale Membran verantwortlich sind. Das Ziel der Arbeit ist eine funktionelle Charakterisierung von Pxa1p-Pxa2p.

Bei den homologen ABC-Transportern des Menschen ist die Funktion unklar. Für den homologen Volltransporter aus *Arabidopsis thaliana* wird ein Transport von Fettsäure-CoA Estern vermutet, der mit einer Abspaltung der CoA Gruppe einhergeht. Die Charakterisierung der Transporter aus *S. cerevisiae* soll daher einen wertvollen Beitrag zum Verständnis der Funktion liefern.

ATPase Messungen mit verschiedenen potenziellen Substraten und direkte Transportmessungen mit einem neu synthetisierten SL-Oleoyl-CoA Analogon sollen dazu genutzt werden, die vermutete Funktion nachzuweisen und Auskunft über die Substratspezifität zu geben. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob weitere Proteine und Co-faktoren am Transport beteiligt sind.

Als Modellsystem zur Simulation von peroxisomalen Transportprozessen, werden die ABC-Transporter in Proteoliposomen rekonstituiert. Dazu werden sowohl angereicherte peroxisomale Membranen aus Wildtypzellen und Deletionsmutanten als auch aufgereinigte epitopmarkierte Varianten der ABC-Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien stammen, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Schnelldorf). Zymolyase für die Protoplastierung der Zellen wurde von Seikagaku Corporation (Tokyo, Japan) bezogen und Nycodenz für die Dichtegradientenzentrifugation wurde von der Firma Axis-Shield (Oslo, Norwegen) verwendet. Radioaktiv markiertes ^{14}C -Lauroyl-CoA für die Substratstabilitätsuntersuchungen stammt von MB Biomedicals (Aurora, USA) und ^{14}C -Oleoyl-CoA wurde von American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, USA) bezogen. Für die Solubilisierung von Membranproteinen wurde β -Dodecylmaltosid von Glycon Biochemicals (Luckenwalde) verwendet. Restriktionsenzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und für die PCR wurden Reagenzien von BioRad (Hercules, USA) verwendet. Der EnzChek Phosphat Assay Kit für die Bestimmung der ATPase Aktivität stammt von Invitrogen (Frederick, USA) und vanadatfreies ATP stammt von Roche Diagnostics (Mannheim). Die Bradfordlösung RotiNanoquant, stammt von der Carl Roth KG (Karlsruhe), der micro BCA Kit für die Proteinkonzentrationsbestimmung der Fraktionen des Dichtegradienten und der Elutionsfraktionen stammt von Pierce (Rockford, USA). Von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) stammen die Phospholipide. Für die radioaktiven ATPase Messungen wurde $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Adenosin-5'-triphosphat von GE-Healthcare (Freiburg) bezogen, die Szintillationsflüssigkeit Lumasafe Plus stammt von Lumac Lsc. (Groningen, Niederlande). Das 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -Adenosin-5'-triphosphat wurde von ALT Inc. (Lexington, USA) bezogen. Das SL-Oleoyl-Coenzym A mit paramagnetischer Doxylgruppe (Spin-Label) für die Transportuntersuchungen wurde von Frau Dr. Anne-Katrin Windeck synthetisiert.

3.2 Geräte

Agarose Gelelektrophorese System	BioRad
Flüssigkeitsszintillationszähler 1600 TR	Packard
Fraktionenheber Auto Densi-Flow	Labcono
Gelelektrophorese-Mini Protean System	BioRad
Gradientenmischer	Gradient master
Hochgeschwindigkeitszentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter
HPLC-System Gold	Beckman
PCR System MyCycler	BioRad
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Phosphorimager Image Analyser FLA3000, BASReader Software	FujiFilm
Photometer UV1	Thermo
Plattenlesegerät FLUOstar Optima	BMG Labtechnologies
Schüttelinkubator C25KC Incubator Shaker Classic Series	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Thermoshake	Gerhardt
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus
Tischzentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus
Ultrazentrifuge XL-70	Beckman
Western-blot Semi-Dry Apparatur	BioRad

3.3 Biologisches Material

3.3.1 Hefestämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme wurden von Prof. Dr. Hanspeter Rottensteiner von der Ruhr-Universität Bochum zur Verfügung gestellt.

Name	Beschreibung
BJ1991	<i>MATα, leu2, trp1, ura3-251, prb1-1122, pep4-3, gal2</i>
BJ1991 $pxa2\Delta$	<i>MATα, pxa2::LEU2, leu2, trp1, ura3-251, prb1-1122, pep4-3, gal2</i>
BJ1991 $pxa1\Delta$	<i>MATα, pxa1::LEU2, leu2, trp1, ura3-251, prb1-1122, pep4-3, gal2</i>
BJ1991 $pxa2\Delta pxa1\Delta$	<i>MATα, pxa2::LEU2, pxa1::KanMX4, leu2, trp1, ura3-251, prb1-1122, pep4-3, gal2</i>
BY4742 <i>P_{Gal1}PXA1</i> <i>P_{Gal1}PXA2</i>	<i>MATα, his3Δ1::P_{Gal1} KlyvHis5; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0, P_{Gal1} kanMX6</i>

3.3.2 Bakterienstämme

Name	Beschreibung
DH5 α	<i>F⁻ endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) glnV44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lacIZYA-argF)U169 M15 Φ80Δ</i>
BL21 (DE3)	<i>F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻, m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>
Xli Blue	<i>recA1 endA, gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F['], proAB, lacI^fZΔM15, Tn10 (Tet^r)]^c</i>

3.3.3 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Hefeexpressionsvektoren wurden von Michael Schneider in Bochum kloniert. Die Basisvektoren für die folgenden Konstrukte sind die „Shuttle-Vektoren“ pRS414 und pRS416 mit Ölsäure induzierbarem *FOX1*-Promotor und TRP1 bzw. URA3 als Selektionsmarker.

Bezeichnung	Beschreibung	Marker
pMSC45	Pxa2p-(His) ₆	URA3
pMSC49	Pxa2p-FLAG	TRP1
PMSC50	Pxa2p-STREP	TRP1
pMSC52	Pxa1p-(His) ₆	URA3
PMSC69	Pxa1p-(His) ₆ K650E	URA3
PMSC70	Pxa2p-FLAG K510E	TRP1

E. coli Expressionsplasmide für die Expression von Proteinepitopen zur Antikörper Generierung wurden durch Klonierung der Epitop cDNA in die NcoI/NotI Schnittstelle eines pET24 Abkömmlings (von Hanspeter Rottensteiner) kloniert. Dieser pET24 Abkömmling enthält keine Proteaseschnittstelle zwischen (His)₆-Epitop und NcoI Schnittstelle.

Bezeichnung	Beschreibung
pETPxa1-His(AS 708-870)	pET-Vektor mit N-terminalem (His) ₆ -Epitop vor Pxa1p Epitop AS 708-870
pETPxa2-His(AS 628-838)	pET-Vektor mit N-terminalem (His) ₆ -Epitop vor Pxa2p Epitop AS 628-838

3.3.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von Invitrogen synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz und Motive
Pxa1/NcoI	5'-CAT GCC ATG GGC TTT GAT AGG GGG TTT AGA-3' (30mer)
Pxa1/NotI	5'-ATA GTT TAG CGG CCG CAT TAT CAA ATA ATT TCA AGC TT-3' (38mer)
Pxa2/NcoI	5'-CAT GCC ATG GGC TCG ACG GAA GAC AAT CAG-3' (30mer)
Pxa2/NotI	5'-ATA GTT TAG CGG CCG CAT TAC AAG CTT TTA TTG TTT CT-3' (38mer)

3.3.5 Antiseren

Antiserum gerichtet gegen	Verdünnung, Inkubationszeit, Temperatur	Quelle
αPcs60p	1:5000, 14 h, 4 °C	Rottensteiner Bochum
αAac2p	1:10 000, 1 h, RT	Rottensteiner Bochum
αIgG (Kaninchen) Meerrettich peroxidase-Konjugat	1:5000, 1 h, RT	BioRad, (München) Kat.-Nr.: 172-1019
αIgG (Maus) Meerrettich peroxidase-Konjugat	1:5000, 1 h, RT	BioRad, (München) Kat.-Nr.: 172-1011
αFLAG (M2)	1:400, 1 h, RT	Sigma-Aldrich, (Stein- heim) Kat.-Nr.: F3165
αHis	1:200-1:500, 14 h, 4 °C	Roche, (Mannheim) Kat.-Nr.: 1922416
αPxa1p	1:2000, 1 h, RT	diese Arbeit
αPxa2p	1:2000, 1 h, RT	diese Arbeit

3.4 Medien

E. coli Medien

LB-Medium

1,0% (w/v)	Bacto™ Trypton
0,5% (w/v)	Bacto™ Hefeextrakt
0,5% (w/v)	NaCl
1 ml/l	1 M NaOH

LB-Agar

wie LB-Flüssigmedium

1,5% (w/v)	Agar
------------	------

LB-Selektivmedium

Zugabe von 0,1% Antibiotikum Stammlösung

Stammlösungen:

Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin	25 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenicol	34 mg/ml in EtOH

S. cerevisiae Medien

SD-Medium

0,17% (w/v)	Hefe-Stickstoff Basis
0,5% (w/v)	Ammoniumsulfat
Abhängig vom	
0,0055% (w/v)	Adenin
0,0055% (w/v)	L-Thyrosin
0,0055% (w/v)	Uracil
pH 6,5-7,5 mit NaOH einstellen	
Zugabe nach dem Autoklavieren	
2,0% (w/v)	Glukose aus 40% Stammlösung
1,0% (v/v)	Aminosäurestammlösung

SD-Agar

wie SD-Flüssigmedium

2,0% (w/v)	Agar
------------	------

Ölsäurestammlösung

10 g Ölsäure und 1 g Tween-80 mit H₂O auf 75 ml auffüllen. 2 h im Wasserbad bei 100 °C unter Rühren auf dem Magnetrührer kochen. Danach 17,7 ml 1 M NaOH zugeben und Lösung auf 100 ml mit H₂O auffüllen. Anschließend noch einmal 1 h im Wasserbad bei 100 °C auf dem Magnetrührer kochen.

YPD-Medium

1,0% (w/v)	Bacto™ Hefeextrakt
2,0% (w/v)	Bacto™ Pepton
Zugabe nach dem Autoklavieren	
2,0% (w/v)	Glukose bzw. Galaktose aus 40% Stammlösung

YPD-Agar

wie YPD-Flüssigmedium

2,0% (w/v)	Agar
------------	------

Aminosäurestammlösung

Abhängig vom Hefestamm

0,2% (w/v)	L-Arginin
0,1% (w/v)	L-Histidin
0,6% (w/v)	L-Leucin
0,6% (w/v)	L-Isoleucin
0,4% (w/v)	L-Lysin
0,1% (w/v)	L-Methionin
0,6% (w/v)	L-Phenylalanin
0,5% (w/v)	L-Threonin
0,4% (w/v)	L-Tryptophan

Glukosereduziertes Medium

0,1% (w/v)	Bacto™ Hefeextrakt
0,17% (w/v)	Hefe-Stickstoff Basis
0,5% (w/v)	Ammoniumsulfat
Abhängig vom Hefestamm	
0,0055% (w/v)	Adenin
0,0055% (w/v)	L-Thyrosin
0,0055% (w/v)	Uracil
pH 6,0 mit KOH einstellen	
Zugabe nach dem Autoklavieren	
0,3% (w/v)	Glukose aus 40% Stammlösung
1,0% (v/v)	Aminosäurestammlösung

Ölsäure-Induktionsmedium

0,1% (w/v)	Bacto™ Hefeextrakt
0,17% (w/v)	Hefe-Stickstoff Basis
0,5% (w/v)	Ammoniumsulfat
Abhängig vom Hefestamm	
0,0055% (w/v)	Adenin
0,0055% (w/v)	L-Thyrosin
0,0055% (w/v)	Uracil
pH 6,0 mit KOH einstellen	
Zugabe nach dem Autoklavieren	
0,1% (w/v)	Glukose aus 40% Stammlösung
1,0% (v/v)	Aminosäurestammlösung
1,0% (v/v)	Ölsäurestammlösung

Agarplatten mit Ölsäure

0,1% (w/v)	Bacto™ Hefeextrakt
0,17% (w/v)	Hefe-Stickstoff Basis
0,5% (w/v)	Ammoniumsulfat
0,5% (v/v)	1 M KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH 6
0,0055% (w/v)	Adenin
0,0055% (w/v)	L-Thyrosin
0,0055% (w/v)	Uracil
2% (w/v)	Agar
0,125% (w/v)	Ölsäure
0,5% (w/v)	Tween 80
Zugabe nach dem Autoklavieren	
1,0% (v/v)	Aminosäurestammlösung

3.5 Lösungen und Puffer

Proteinaseinhibitor (PIC) Cocktail (1000x)

1 mg/ml	Apoprotein
1 mg/ml	Leupeptin
1 mg/ml	Pepstatin
5 mg/ml	Antipain
157 mg/ml	Benzamidin
in DMSO lösen	

PMSF Stammlösung

0,5 M	PMSF
in Isopropanol lösen	

SDS-PAGE Laufpuffer (10x)

3,03% (w/v)	Tris
11,4% (w/v)	Glycin
1,0% (w/v)	SDS

SDS-PAGE Probenpuffer reduzierend (4x)

5,0% (w/v)	SDS
0,05% (w/v)	Bromphenolblau
25% (v/v)	Glycerin
25% (v/v)	β-Mercaptoethanol
50% (v/v)	1 M Tris /HCl pH 6,8

PBS-Puffer

0,14 M	NaCl
2,7 mM	KCl
3,2 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
mit HCl auf pH 7,4 einstellen	

TBS-Puffer

50 mM	Tris
138 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
mit HCl auf pH 8,0 einstellen	

Coomassie Färbelösung für Proteingele

0,25%	Coomassie Brilliant Blue G-250
45%	Ethanol
10%	Eisessig

Entfärbelösung für Proteingele

40%	Ethanol
7,5%	Eisessig

Transferpuffer

4% (v/v)	10x Laufpuffer
20% (v/v)	Methanol
0,06% (w/v)	SDS

SDS-Gele

	<u>Trenngel 10%</u>	<u>Trenngel 12%</u>	<u>Sammelgel</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	1,780 ml	2,133 ml	324 µl
1,5 M Tris/ HCl pH 8,8	1,778 ml	1,778 ml	—
1 M Tris/ HCl pH 6,8	—	—	400 µl
SDS 10%	69 µl	69 µl	32 µl
APS 10%	89 µl	89 µl	16 µl
TEMED	5 µl	5 µl	4 µl
H ₂ O	3,389 ml	3,035 ml	1,236 ml

3.6 Methoden

3.6.1 Anreicherung von peroxisomalen Membranen

Kultivierung

Zur Anreicherung von peroxisomalen Membranen wurde der *S. cerevisiae* Wildtypstamm BJ991 oder die Mutante BJ1991 $pxa2\Delta$ in 10 ml SD-Medium inokuliert und 12 h bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden 100 ml glukosereduziertes Medium mit 10 ml aus der ersten Vorkultur beimpft und weitere 24 h inkubiert. Die Hauptkultur in 1 l Ölsäureinduktionsmedium wurde auf eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,1 angeimpft und für weitere 14 h inkubiert.

Ernte und Aufschluss

Nach der Kultivierung wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C geerntet (Beckman Avanti, Rotor JLA10.500). Das Zellpellet wurde vereinigt und in H₂O (eiskalt) 2 - 3 mal gewaschen, bis der Überstand klar war. Anschließend wurden die Zellen für 10 min in frischem DTT-Puffer bei 30 °C inkubiert und danach mit 1,2 M Sorbitolpuffer gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen zum Zellwandverdau zunächst in einem, auf 30 °C temperierten, Sorbitolpuffer aufgenommen, und mit 500 U Zymolyase/g

Feuchtgewicht versetzt und für 30 - 45 min bei 30 °C unter leichtem Schwenken inkubiert, bis ca. 80% der Zellen sphäroplastierte vorlagen. Die Sphäroplastierung wurde durch Messung der OD₆₀₀ überprüft. Dazu wurden 5 µl Proben der Sphäroplasten sowohl in Sorbitolpuffer als auch in H₂O resuspendiert und nach ca. 5 min die Absorption gemessen. Die Sphäroplasten in Wasser sollten platzen und die Absorption sollte nur ca. 1/10 der Absorption in Sorbitolpuffer betragen. Die Sphäroplasten wurden anschließend im Eisbad gekühlt und zweimal mit Sorbitolpuffer gewaschen (Heraeus Biofuge, 1000 x g, 5 min., 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde in 2-fachem Volumen Aufschluss-Puffer resuspendiert und im Potter-Homogenisator (Braun, Melsungen) bei 500 - 800 rpm, bei 4 °C für ca. 15 min homogenisiert. Im Anschluss wurden nicht aufgeschlossene Zellen, Kerne und Zelltrümmer sedimentiert (Heraeus Biofuge 700 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand mit dem überwiegenden Anteil an Zellorganellen wurde anschließend entweder direkt auf einen Nycodenz Dichtegradienten aufgetragen (siehe unten) oder es wurden zuvor die Organellenmembranen auf ein Saccharosekissen sedimentiert (Beckman-UZ, SW40, 27.000 x g, 40 min, 4 °C). Das Organellensediment wurde anschließend vom Kissen abgenommen und in Aufschlusspuffer resuspendiert.

Dichtegradientenzentrifugation

Ein linearer Nycodenz Dichtegradient wurde durch Überschichtung einer 40%igen Nycodenzlösung mit einer 10%igen Nycodenzlösung und anschließendem Mischen mit dem Gradientenmischer hergestellt. Das Mischprogramm war bereits vom Hersteller programmiert. Der Dichtegradient wurde vorsichtig mit der Organellenlösung überschichtet und anschließend zentrifugiert (Beckman-UZ, SW28, 48.000 x g, 2 h, 4 °C).

Im Anschluss an die Dichtegradientenzentrifugation wurden 1500 µl Fraktionen mit dem Fraktionenheber abgenommen und die Fraktionen wurden bei -15 °C gelagert.

Zur Analytik der Fraktionen wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Markerproteine mittels Immunodetektion nachgewiesen. Parallel wurden die Enzymaktivitäten des peroxisomalen Markerproteins Katalase und des mitochondrialen Markerproteins Citratsynthase zur Beurteilung der Gradientenfraktionen herangezogen.

Puffer und Lösungen:

DTT-Puffer

100 mM	Tris/ HCl pH 9,4
10 mM	DTT

Sorbitolpuffer

1,2 M	Sorbitol
20 mM	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH 7,4

Aufschlusspuffer

5 mM	MES/HCl pH6,0
0,6 M	Sorbitol
0,5 mM	EDTA
1 mM	KCl

Gradientenpuffer

5 mM	MES/HCl pH6,0
0,8 M	Sorbitol
0,5 mM	EDTA
1 mM	KCl
0,1% (v/v)	Ethanol

Saccharose Kissen

76,5% (w/v)	Saccharose
in Gradientenpuffer lösen	

10% Nycodenzlösung

10% (w/v)	Nycodenz
8,55% (w/v)	Saccharose

40% Nycodenzlösung

40% (w/v)	Nycodenz
4,25% (w/v)	Saccharose

Nycodenz und Saccharose in Gradientenpuffer lösen

Katalase Aktivität

Die Katalase Aktivität wurde photometrisch mit dem Absorptionsspektrophotometer UV1 von Thermo wie im Reaktionsschema in Abb. 11 skizziert gemessen.

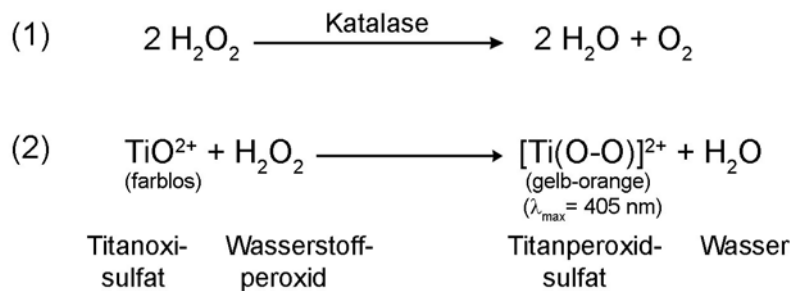


Abb. 11: Reaktionsschema der Katalase Aktivitätsmessung. (1) Die Katalase spaltet Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff. (2) Reste von nicht reduziertem Wasserstoffperoxid reagieren mit dem farblosen Titanoxisulfat zum gelb-orange gefärbten Titanperoxidsulfat, welches ein Absorptionsmaximum bei 405 nm hat.

Zu 200 µl Reaktionsmix wurden 20 µl Probe und 530 µl Substratlösung gegeben. Die Reaktion wurde im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Nach 4 min wurden 650 µl Proben entnommen und in Küvetten mit 350 µl Titan(O)Sulfat/H₂SO₄ Lösung überführt. Die Reaktion des nicht umgesetzten Wasserstoffperoxids mit Titan(O)Sulfat erfolgte nach einer Reaktion erster Ordnung und konnte als Endpunktbestimmung photometrisch bei 405 nm gemessen werden [47].

Reaktionsmix

0,33% (w/v) BSA
2% (w/v) NaCl
0,5% (w/v) Triton X-100

Substratlösung

0,07% (v/v) 30% H ₂ O ₂ -Lösung
0,033 M Imidazol pH 7,0

Titan(O)Sulfat/H₂SO₄ Lösung

5% (w/v) Titan(O)Sulfat
30% (v/v) H ₂ SO ₄

Citratsynthase Aktivität

Die Messung der Citratsynthase Aktivität erfolgte kontinuierlich über die Messung der Reaktionskinetik bei 412 nm im Absorptionsspektrophotometer UV1 von Thermo. Die Messung beruht auf dem in Abb. 12 skizzierten Reaktionsschema. Der Reaktionsmix, bestehend aus 900 µl CS-Assaypuffer, 50 µl Substratlösung und 50 µl Probe, wurde in Mikroküvetten gemischt und sofort vermessen. Zur Auswertung wurden die Absorptionsanstiege verwendet.

CS-Assaypuffer:

2 mM EDTA
50 mM Tris/HCl pH 8,0

Substratlösung:

20% (v/v) 10 mM Oxalacetatlösung in 50 mM Tris/HCl pH 8,0
20% (v/v) 10 mM DTNB-Lösung in CS-Assaypuffer
60% (v/v) 5 mM Acetyl-CoA Lösung in CS-Assaypuffer

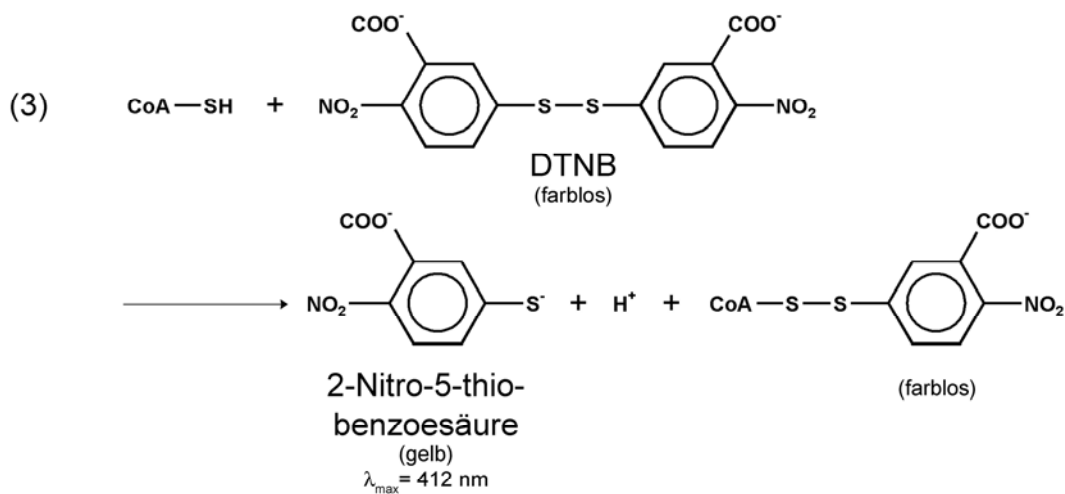
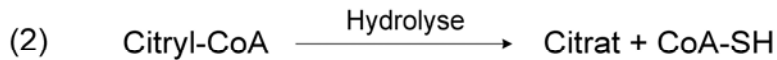


Abb. 12: Reaktionsschema der Citratsynthase Aktivitätsmessung. (1) Die Citratsynthase setzt Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citryl-CoA um. (2) Citryl-CoA zerfällt spontan in Citrat und CoA-SH. (3) CoA-SH reagiert mit dem farblosen DTNB zum Chromophor 2-Nitro-5-thiobenzoate, welcher ein Absorptionsmaximum bei 412 nm hat.

3.6.2 Untersuchung der Stabilität von Coenzym A aktivierten Fettsäuren

Je 250 nCi der Substrate ^{14}C -Lauroyl-CoA (55 mCi/mmol) bzw. ^{14}C -Oleoyl-CoA (55 mCi/mmol) wurden mit und ohne sedimentierte Membranen aus einer Peroxisomenaufreinigung in TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) oder mit aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p in Tris/KCL-Puffer (100 mM KCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4) für 20 oder 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit Methanol : Chloroform (2,2:1) gestoppt. Zur vollständigen Fällung der Proteine wurde bei 4 °C und 13000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Gesamtüberstand wurde auf eine Silikagel 60 TLC-Platte (Merck) aufgetragen und in einem sauren Laufmittelgemisch (n-Butanol/Eisessig/Wasser; 80:30:30) entwickelt [89]. Zur Detektion des ^{14}C -Signals wurde ein Phosphorscreen von FujiFilm über Nacht bestrahlt und anschließend mit dem Phosphorimager analysiert. Zur densitometrischen Quantifizierung der Signale wurde die AIDA Software von Raytest verwendet.

3.6.3 Rekonstitution peroxisomaler Membranproteine

Für die Rekonstitution von peroxisomalen Membranproteinen wurden möglichst reine, angereicherte peroxisomale Membranen aus der Dichtegradientenzentrifugation verwendet. Die entsprechenden Proben mit Nycodenz wurden in TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) oder Hochsalzpuffer [21] (500 mM KCl, 1 mM PMSF, 10 mM Tris/HCl pH 8) resuspendiert und sedimentiert. Hohe Salzkonzentrationen dienten dazu membranassoziierte Proteine abzutrennen. Die Fraktionen wurden in Puffer mindestens 1:5 verdünnt und sedimentiert (UZ, Rotor 70.1Ti, 100.000 x g, 45 min, 4 °C). Anschließend wurden die Proben in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und mit 0,8% (w/v) Triton X-100 versetzt. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurde die Probe 45 min bei 4 °C rotierend inkubiert (Labquake). Nicht solubilisierbare Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (UZ, Rotor 70.1Ti, 177.000 x g, 35 min, 4 °C). Für die Bildung der Vesikel wurde Ei-PC (Phosphatidylcholin aus Hühnereiern) verwendet. 4,5 µmol Ei-PC aus einer Chloroform Stammlösung wurde unter Stickstoff abgedampft und mit 500 µl TE-Puffer + 0,8% Triton X-100 versetzt. Zur Ei-PC Suspension wurde die solubilisierbare Membranproteinprobe gegeben und das Volumen auf 1 ml aufgefüllt. Zum Entzug des Detergens wurde die Probe sukzessiv mit 100 mg und 200 mg gewaschenen BioBeads (siehe unten) rotierend inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 3 - 4 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde der Überstand von den BioBeads abgenommen und die BioBeads mit 1 ml TE-Puffer gespült. Die Lösungen wurden vereinigt und auf 8 ml mit TE-Puffer aufgefüllt. Die Vesikel wurden durch Zentrifugation geerntet (UZ, Rotor 70.1Ti, 200.000 x g, 50 min, 4 °C) und anschließend in 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Homogenisiert wurden die Vesikel in einem 1 ml Potter-Homogenisator mit eng sitzendem Stempel.

Die Vesikel wurden entweder gleich verwendet oder sie wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75 °C gelagert.

Waschen der BioBeads

Die BioBeads wurden in je 25 ml/g nacheinander zweimal in Methanol, dreimal in H₂O und zweimal in TE- bzw. Tris/KCl-Puffer (100 mM KCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4) gewaschen. Dazu wurden die BioBeads mit der Waschlösung für ca. 20 min vorsichtig auf dem Magnetrührer gerührt [51].

3.6.4 Generierung spezifischer Antikörper gegen Pxa1p und Pxa2p

Für die Immunisierung von Kaninchen zur Produktion von polyklonalen Antikörpern gegen Pxa1p und Pxa2p wurden Proteinfragmente mit (His)₆-Epitop in *E. coli* exprimiert. Für Pxa1p wurde die kodierende DNA für die letzten 163 AS mit einer PCR amplifiziert [78] und für Pxa2p die Sequenz für die Aminosäuren 626-839 [33]. Die PCR-Primersequenzen sind in Abschnitt 3.3.4 zu finden. Als Template für die PCR dienten die Expressionsvektoren pMSC49 und 52. Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Für einen Ansatz wurden 10 - 500 ng DNA-Template, 1/10 vol PCR-Reaktionspuffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 - 1 µM je Primer, 200 µM dNTP-Mix und 1 - 5 U BioRad iTaq Polymerase eingesetzt. Das Volumen wurde mit H₂O aufgefüllt.

Die Reaktionsansätze durchliefen in einem Thermocycler (Eppendorf) ein Temperaturprogramm. Die Reaktion wurde zunächst 2 min bei 95 °C inkubiert und durchlief anschließend 35 mal folgende Schleife:

Denaturierung	bei 95 °C, 20 sec
Primer-Hybridisierung	bei 55 °C, 30 sec
Elongation	bei 72 °C, 1 min

Anschließend wurde der Ansatz 2 min bei 72 °C inkubiert und auf 4 °C gekühlt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels 1% Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Elution der Produkte aus dem Gel mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Nr. 28706) nach Herstellerangaben.

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der Poly-Adenin Überhänge in den pGEM T-easy Vektor (Promega) nach Herstellerangaben kloniert und in *E. coli* Xli-blue Zellen transformiert und mittels „Blau-Weiß Screening“ auf LB-Selektivmedium mit 50 µg/ml Ampicillin analysiert [4]. Positive Klone wurden in LB-Medium kultiviert und die Plasmide mit dem Qiagen Mini-Präp Kit präpariert. Aus den Vektoren wurden die Fragmente für die Ligation mit den Expressionsvektoren mit den Restriktionsenzymen NotI und NcoI (Fermentas) herausgeschnitten. Als Expressionsvektor wurde ein pET24 Abkömmling mit Tac-Promotor von Prof. Hanspeter Rottensteiner verwendet (nicht veröffentlicht), der nur einen sehr kurzen C-terminalen Epitopanhang mit (His)₆-Sequenz (MKHHHHHHPM(Start)...) an das Protein anhängt. Der Expressionsvektor wurde mit NotI/NcoI linearisiert und nach Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (Fermentas) mit dem PXA1 bzw. PXA2 Epitop ligiert und in kompetente DH5α Zellen transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Selektionsmedium mit 25 µg/ml Kanamycin ausplattiert. Kolonien von der Platte wurden im 10 ml Volumen kultiviert und mit dem Qiagen Mini-Präp Kit präpariert. Die Expressionsvektoren wurden durch Sequenzierung verifiziert und in *E. coli* BL(21) transformiert. Nach Induktion der Expression mit IPTG konnten die aggregierten Proteinfragmente aus „inclusion bodies“ unter denaturierenden Bedingungen durch eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose von Hanspeter Rottensteiner aufgereinigt werden. Mit den aufgereinigten Proteinfragmenten wurden bei der Firma Pineda-Antikörper-Service (Schkopauer Ring 5, 12681 Berlin) jeweils zwei Kaninchen immunisiert.

3.6.5 Isolierung der ABC-Halbtransporter Pxa1p-Pxa2p

Es wurde mit zwei verschiedenen Expressionssystemen für die ABC-Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p gearbeitet. Beim ersten System wurden die Proteine mit C-terminalem FLAG- bzw. (His)₆-Epitop von verschiedenen Plasmiden exprimiert (siehe 3.3.3). Der Promotor für die Transkription der *PXA1* und *PXA2* Gene war der fett-säureinduzierbare *FOX1*-Promotor. Die epitopmarkierten Proteine wurden in der doppel „knock-out“ Mutante BJ1991 Δ *pxa1* Δ *pxa2* ohne nativen Hintergrund exprimiert.

Beim zweiten Expressionssystem wurden die Proteine im Stamm BY4742 genomisch N-terminal epitopmarkiert. Dazu wurde am 5'-Ende der Gene ein FLAG- bzw. (His)₆-Epitop und ein galaktoseinduzierbarer Promotor durch homologe Rekombination integriert. Beim Stamm BY4742 *P_{Gal1}PXA1* *P_{Gal1}PXA2* führte ein Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glukose zu Galaktose zu einer Überexpression der ABC-Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p.

Da beide Expressionssysteme unterschiedliche genetische Hintergründe hatten, wurden sie unterschiedlich kultiviert.

Kultivierung für die Aufreinigung der C-terminal epitopmarkierten Proteine von Plasmiden

Die erste Vorkultur des Stammes BJ1991 $\Delta pxa1\Delta pxa2\Delta$ transformiert mit den Expressionsvektoren pMSC49 und pMSC52 wurde in SD-Medium ohne L-Tryptophan und Uracil (Selektionsmarker) kultiviert. Dazu wurden 10 - 20 ml SD-Medium mit einer Einzelkolonie von Agarplatte inokuliert und 24 h bei 28 °C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die zweite Vorkultur in 200 - 300 ml glukosereduziertem Medium (siehe 3.4) ohne L-Tryptophan und Uracil wurde 1%ig aus der ersten Vorkultur inokuliert und weitere 24 h bei 28 °C inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 4 - 6 l Ölsäureinduktions-Medium auf eine OD₆₀₀ ~0,2 beimpft. Dazu wurde die OD vor Zugabe der trüben Ölsäurestammlösung eingestellt, da nach Zugabe der Ölsäuremischung keine OD Messung mehr möglich ist. Die Hauptkultur wurde 14 - 18 h bei 28 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator kultiviert.

Kultivierung für die Aufreinigung der N-terminal genomisch epitopmarkierten Proteine

Die genomisch epitopmarkierten Proteine wurden vom Stamm BY4742 $P_{Gal1}PXA1 P_{Gal1}PXA2$ exprimiert. Dieser Stamm wurde in YPD-Medium (siehe 3.4) kultiviert. Die erste und die zweite Vorkultur wurden 12 - 24 h bei 28 °C in YPD-Medium + 2% Glukose kultiviert. Aus der zweiten Vorkultur wurden 4 - 6 l YPD-Medium + 2% Galaktose auf eine OD₆₀₀ ~0,2 beimpft. Zur Hauptkultur wurden anschließend 5% Ölsäurestammlösung zugegeben. Die Hauptkultur wurde 14 - 18 h bei 28 °C und 220 rpm in einem Schüttelinkubator kultiviert.

Ernte und Aufarbeitung

Die Ernte und Aufarbeitung der Zellen beider Expressionssysteme wurde identisch durchgeführt. Zur Ernte der Zellen wurden die Kulturen in 400 ml Zentrifugenbecher überführt und bei 5000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert (Beckman Avanti, Rotor JLA10.500). Die Zellen wurden in H₂O resuspendiert, vereinigt und wiederholt gewaschen, bis der Überstand klar war. Die Zellen wurden im 3-fachen Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert und mit dem 4-fachen Volumen an Glasperlen ($\varnothing = 0,5$ mm) versetzt. Der Zellaufschluss wurde durch fünfmaliges Vortexen der Zellen mit den Glaskugeln für eine Minute durchgeführt. Zwischen den Vortex-Zyklen wurden die Zellen jeweils für eine Minute im Eisbad gekühlt. Zum Abtrennen der Zelldebris und der Glaskugeln wurde 5 min bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert (Heraeus Biofuge) und der Überstand abgenommen. Die Glaskugeln wurden mit demselben Aufschlusspuffer-Volumen wie oben gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände mit allen löslichen Proteinen und den meisten Organellenmembranen wurden vereinigt und zur Sedimentation der Membranen zentrifugiert (UZ, Rotor 45Ti, 58.000 x g, 45 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Organellensediment wurde in 30 - 50 ml Solubilisierungspuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Organellensuspension wurde bestimmt (RotiNanoquant) und auf 1 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde die Organellensuspension mit 1% (w/v) β -Dodecylmaltosid (DDM) versetzt und 2 - 3 h bzw. über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach der Detergenssolubilisierung wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt (UZ, Rotor 45Ti, 150.000 x g, 45 min, 4 °C) und das Lysat wurde mit 14 μ l/ml ANTI-FLAG (M2)-Affinity Gel für 2 - 3 h bzw. über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Nach der Bindung des FLAG-Fusionsproteins an die Matrix wurde das Gel in der Tischzentrifuge (Heraeus Biofuge) bei 4 °C und 1000 x g für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Gel wurde mit Solubilisierungspuffer gewaschen und erneut sedimentiert. Anschließend wurde das Gel in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefä-

ße überführt und mit 1 - 2 ml Fraktionen Elutionspuffer 2 - 5 min inkubiert. Die Matrix wurde in der Eppendorffzentrifuge bei 1000 x g und 4 °C für 1 min sedimentiert und der Überstand mit dem eluierten FLAG-Fusionsprotein wurde abgenommen. Die Elution wurde noch dreimal wiederholt. Zur Analyse der Aufreinigung wurden äquivalente Volumina von Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte mittels SDS-PAGE und Immundetektion analysiert. Für die Immundetektion, wurde falls nicht anders angegeben, der α FLAG (M2)-AK verwendet. Zur Beurteilung der Reinheit der Elutionsfraktionen wurden gleiche Volumina aus den Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Elutionsfraktionen wurde der micro BCA Kit von Pierce nach vorherige DOC/TCA-Fällung (siehe 3.6.13) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Puffer:

Aufschlusspuffer

50 mM	Tris/ HCl pH 7,4
100 mM	KCl

Solubilisierungspuffer

50 mM	Tris/ HCl pH 7,4
100 mM	KCl
20% (w/v)	Glycerin

Elutionspuffer

50 mM	Tris/ HCl pH 7,4
100 mM	KCl
20% (w/v)	Glycerin
0,05% (w/v)	DDM
100 µg/ml	3 x FLAG-Peptid

3.6.6 Native Gelelektrophorese und ATPase Aktivitätsmessung im Gel

Die native Gelelektrophorese wurde wie bei Schagger und Jagow beschrieben durchgeführt [73], das Volumen der Gele wurde jedoch auf Mini-Gele herunterskaliert. Der Nachweis der ATPase Aktivität erfolgte wie bei Prescott *et al.* beschrieben [60].

3.6.7 Untersuchung der ATP Bindung

Die ATP Bindung wurde durch einen Bindungstest von radioaktivem 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP an Pxa1p und Pxa2p und durch einen Kompetitionstest von radioaktivem 8-azido ATP mit unmarkiertem ATP wie bei Hofacker, *et al.* [37] beschrieben untersucht. Außerdem wurde die ATP Bindung in An- und Abwesenheit von MgCl_2 und Oleoyl-CoA bei 4 °C und 27 °C sowie das „Nukleotidtrapping“ in Anwesenheit verschiedener Phosphation Analoga, die die Freisetzung des hydrolysierten 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATPs verhindern, untersucht.

Zur Untersuchung der Nukleotidbindung in An- und Abwesenheit von MgCl_2 und Oleoyl-CoA, wurde aufgereinigtes Pxa1p-Pxa2p (0,5 - 1 µM) in Tris/KCl Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM KCl) mit 5 µM 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP, mit und ohne 5 mM MgCl_2 und mit und ohne 100 µM Oleoyl-CoA für 10 min bei 4 °C und 27 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min mit UV-Licht (245 nm, 8W) auf Eis bestrahlt. Die Proben wurden danach mittels SDS-PAGE in einem 12%igen Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Nach dem Trocknen der Gele wurde ein Phosphorscreen von FujiFilm mit den Proben bestrahlt und im Phosphorimager detektiert. Die densitometrische Analyse der Daten wurde mit der Software AIDA von Raytest durchgeführt.

„Nukleotidtrapping“-Experimente wurden mit aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p (0,5 - 1 μ M) mit 5 μ M 8-azido- $[\alpha$ - 32 P]-ATP, 5 mM $MgCl_2$ und verschiedenen Inhibitoren in Tris/KCl Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM KCl) durchgeführt. Die Proben wurden im Dunkeln für 20 min bei 27 °C inkubiert. Anschließend wurden 12,5 mM unmarkiertes ATP (pH 7,4) zugegeben und erneut 10 min bei 27 °C inkubiert, um ungetrapptes 8-azido- $[\alpha$ - 32 P]-ADP zu verdrängen. Anschließend wurden die Proben für 5 min mit UV-Licht (245 nm, 8W) auf Eis bestrahlt und auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach der Färbung und Trocknung der Gele wurde ein Phosphorscreen von FujiFilm mit den Proben bestrahlt und im Phosphorimager detektiert.

Als Inhibitoren wurden Berylliumfluorid, Aluminiumfluorid und Na-Orthovanadat eingesetzt. Von den Inhibitoren wurden 20 mM Stammlösungen in Wasser hergestellt und in einer finalen Konzentration von 1 mM eingesetzt. Zur Herstellung einer 20 mM Berylliumfluorid-Stammlösung wurden 20 mM $BeSO_4$ mit 100 mM NaF versetzt [70]. Zur Herstellung der Na-Orthovanadat Stammlösung wurden 817 mM Na-Orthovanadat in Wasser gelöst und der pH-Wert auf 10 eingestellt. Die gelbliche Lösung wurde unter Rühren auf 100 °C erhitzt bis sie farblos wurde. Anschließend wurde die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt und der pH-Wert erneut auf 10 eingestellt. Die Lösung wurde wiederholt erhitzt, abgekühlt und der pH-Wert auf 10 eingestellt, bis er sich bei 10 stabilisiert hatte. Die Stammlösung wurde auf 700 mM mit Wasser verdünnt. Zur Gewinnung einer Arbeitslösung wurde die Na-Orthovanadat Stammlösung auf 20 mM verdünnt.

Zur Bestimmung der Affinität von 8-azido- $[\alpha$ - 32 P]-ATP zu Pxa1p und Pxa2p wurde ein Bindungsexperiment durchgeführt. Für das Experiment wurde aufgereinigtes Pxa1p-Pxa2p (0,8 μ M N-terminal- bzw. 1 μ M C-terminal epitopmarkiert) mit 5 mM $MgCl_2$ und steigenden 8-azido- $[\alpha$ - 32 P]-ATP Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 μ M) für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min mit UV-Licht (245 nm, 8 W) auf Eis bestrahlt. Danach wurden die Proben mit SDS-PAGE in einem 12%igen Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Nach dem Trocknen der Gele wurde ein Phosphorscreen von FujiFilm mit den Proben bestrahlt und im Phosphorimager detektiert. Die densitometrische Analyse der Daten wurde mit der Software AIDA von Raytest durchgeführt. Die Intensitäten wurden gegen die 8-azido- $[\alpha$ - 32 P]-ATP Konzentration aufgetragen und die Dissoziationskonstante K_D (8-azido-ATP) durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Verwendung der Langmuir'schen Sättigungsisotherme (Gleichung 1) bestimmt.

$$[RL] = \frac{R_{total} \cdot [L]}{K_{D(8-azido-ATP)} + [L]} \quad (Gl. 1)$$

[20] entspricht der spezifischen Bindung des Radioliganden, R_{total} ist die maximale Ligandenbindung, $[L]$ entspricht der freien Konzentration des Radioliganden und $K_{D(8-azido-ATP)}$ ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligandenbindung.

Für den Kompetitionstest zur Ermittlung der IC_{50} , der halbmaximalen Inhibierungskonzentration von ATP wurde aufgereinigtes Pxa1p-Pxa2p (0,8 - 1 μ M) mit 5 mM $MgCl_2$ und 5 μ M 8-azido- $[\alpha$ - 32 P]-ATP mit einer in Dezimalschritten steigenden ATP Konzentration von 0 - 1000 μ M für 5 min auf Eis inkubiert und für 5 min mit UV-Licht (245 nm, 8W) auf Eis bestrahlt. Die Proben wurden anschließend mit SDS-PAGE in einem 12%igen Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Nach dem Trocknen der Gele wurde ein Phosphorscreen von FujiFilm mit den Proben bestrahlt und im Phosphorimager detektiert. Die densitometrische Analyse der Daten wurde mit

der Software AIDA von Raytest durchgeführt. Die hintergrundbereinigte und genormte prozentuale Inhibierung I der 8-azido-ATP Bindung (Gleichung 2) wurde gegen die logarithmische ATP Konzentration $[ATP]$ aufgetragen.

$$I = \frac{(I_i - I_0)100}{(I_{\max} - I_0)} - 100 \quad (\text{Gl. 2})$$

I : Inhibierung [%]
 I_i : hintergrundbereinigte densitometrische Intensität
 I_0 : densitometrische Intensität Minimum
 I_{\max} : densitometrische Intensität Maximum

Zur Ermittlung der halbmaximalen Inhibitorkonzentration IC_{50} , wurden die Datenpunkte mit einer Hill-Funktion (Gleichung 3) angepasst. Der Hill-Koeffizient gibt dabei an, ob die Bindungsstellen positive oder negative Kooperativität besitzen. Bei $n = 1$ besteht keine Kooperativität.

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{[ATP]} \right)^n} \quad (\text{Gl. 3})$$

I : Inhibierung [%]
 I_{\max} : maximale Inhibierung [%]
 IC_{50} : halbmaximale Inhibierung
 $[ATP]$: ATP Konzentration [μM]
 n : Hill-Koeffizient ($n < 1$: negative Kooperativität; $n > 1$: positive Kooperativität)

Durch Anwendung der Cheng-Prusoff Gleichung für kompetitive Hemmung (Gleichung 4) wurde die Dissoziationskonstante $K_{D(ATP)}$ aus dem IC_{50} Wert für ATP und der Dissoziationskonstante $K_{D(8\text{-azido-ATP})}$ abgeleitet. Die Cheng-Prusoff Gleichung ergibt nur einen groben Anhaltswert für die Dissoziationskonstante $K_{D(ATP)}$.

$$K_{D(ATP)} = \frac{IC_{50}}{1 + \left(\frac{[8\text{-azido-ATP}]}{K_{D(8\text{-azido-ATP})}} \right)} \quad (\text{Gl. 4})$$

$[8\text{-azido-ATP}]$: 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP Konzentration [μM]

3.6.8 Untersuchung der ATPase Aktivität

Die Messung der ATPase Aktivität erfolgte mit dem EnzChek Phosphat Assay, einem kommerziell erhältlichen Nachweis freien Phosphats. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit dieser Messmethode wurden zusätzlich radioaktive ATPase Messung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP, weitgehend wie bei Hofacker *et al.* beschrieben, durchgeführt [37].

Unterschiedliche Proteinkonzentrationen wurden in Tris/KCl Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM KCl) mit 0,05% (w/v) DDM, 4 mM ATP, 5 mM MgCl_2 100 μM Oleoyl-CoA und 2 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP versetzt. Ebenso wurden Parallelversuche ohne Oleoyl-CoA und Kontrollen ohne MgCl_2 bzw. unter Zusatz von Inhibitoren durchge-

führt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 50 µl, die Reaktionsansätze wurden auf Eis gemischt und anschließend für 30 min bei 27 °C inkubiert. Zum Abbruch der Reaktion wurden die Proben auf Eis transferiert und mit 1,5 ml Reagenz A (10 mM Ammoniummolybdat in 1 M HCl) versetzt. Die Proben wurden in Glasröhrchen überführt und mit 15 µl H₃PO₄ (20 mM) und mit 3 ml Reagenz B (Isobutanol, Cyclohexan, Aceton und Reagenz A im Verhältnis 5:5:1:0,1) versetzt. Die Lösungen wurden für 30 s kräftig gevortexed und anschließend zur Phase-separation für 5 min auf Eis inkubiert. Je 1 ml des orangefarbenen organischen Überstandes wurde mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit „Lumasafe Plus“ (Lumac Lsc.) in Szintillationsgefäßen (20 ml, Zinser Analytic) versetzt und das freigesetzte ³²P_i wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler quantifiziert.

Die nicht radioaktive ATPase Aktivitätsmessung wurde mit dem Absorptionsspektrophotometer UV1 von Thermo und dem EnzChek Phosphat Assay von Invitrogen durchgeführt [94]. Die Messung beruht auf dem in Abb. 13 skizzierten Reaktionsschema. Das Substrat MESG reagiert über eine Enzymkatalysierte (PNP) Reaktion mit anorganischem Phosphat (P_i), das bei der ATP Hydrolyse freigesetzt wird. Das Reaktionsprodukt dieser Reaktion ist ein Chromophor mit einem Absorptionsmaximum von 360 nm. Der Messbereich des Assays liegt zwischen 2 - 150 nM P_i. Die ATPase Inhibitoren Vanadat und Natriumazid stören den Assay. Die Einzelkomponenten des Assays wurden nach Herstellerangaben behandelt. Dem Reaktionsmix in Quartz-Mikroküvetten wurde direkt vor Beginn der Messung 5 - 100 µl Probe zugegeben. Die Reaktion wurde im temperierten Photometer (28 °C) bei einer Wellenlänge von 360 nm über 30 min hinweg gemessen.

Reaktionsmix

108,75 µl- x - y	Wasser + 0,05% (w/v) DDM
0,75 µl	1M MgCl ₂ Lösung
7,5 µl	1 M Tris /HCl pH 7,4
30 µl	MESG
y = +/- 15 µl	1mM Transportsubstrat
1,5 µl	PNP
1,5 µl	50 mM ATP pH 7,4
x = 5 - 100 µl	Probe
150 µl	Summe

Die ATPase Messung wurde mit und ohne Protein unter Zugabe verschiedener potenzieller Transportsubstrate, meist Oleoyl-CoA, durchgeführt. Die teilweise sehr hydrophoben Substrate wurden in einer Konzentration von 100 µM aus einer 1 mM wässrigen Stammlösung zu den Reaktionen gegeben.

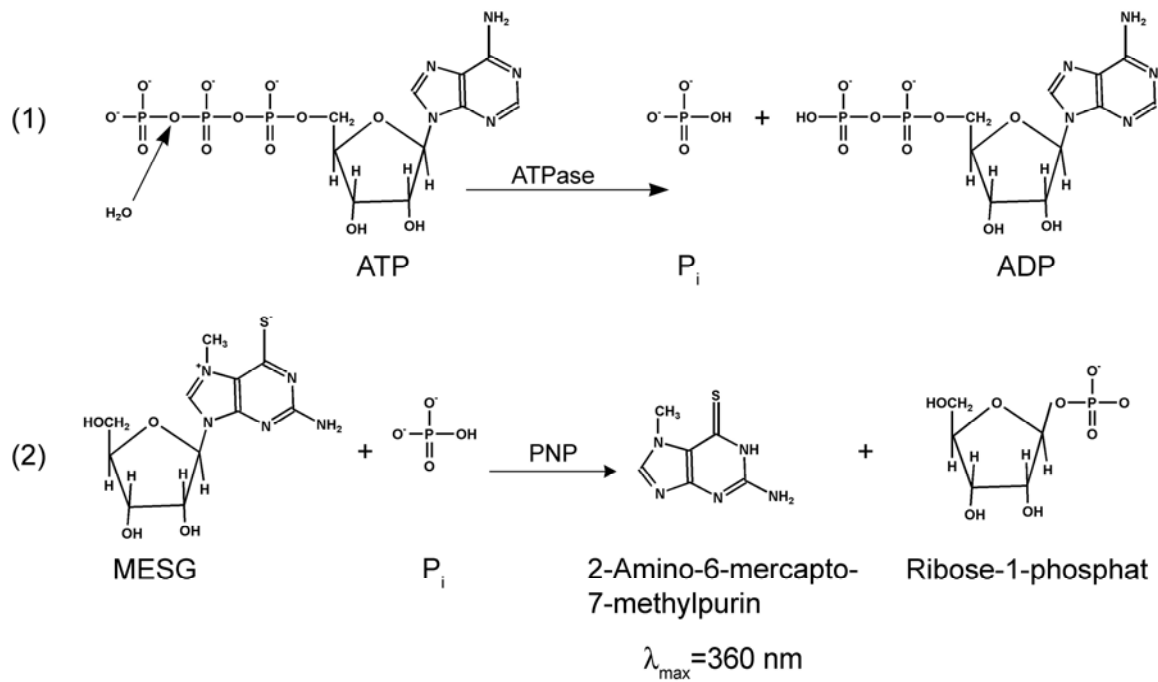


Abb. 13: Reaktionsschema der ATPase Aktivitätsmessung. (1) ATP wird durch die ATPase hydrolysiert und es entstehen die Reaktionsprodukte ADP und P_i . (2) In einer Enzymkatalysierten Reaktion der Purin Nukleosid Phosphorylase (PNP) reagiert P_i mit dem farblosen MESG zum Farbstoff 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurin, der bei 360 nm detektiert werden kann.

Für die Auswertung wurden die Absorptionsanstiege verwendet. Die Anstiege mussten über einen längeren Zeitraum hinweg linear sein, im anderen Fall wurde die Probenmenge variiert. Zur Korrelation der Absorptionsanstiege (ΔOD_{360}) mit der freigesetzten P_i Konzentration wurde eine Phosphateichgerade aufgenommen (siehe Abb. 14). Dazu wurden 0 – 20 nmol Natriumhydrogenphosphat zum Reaktionsmix gegeben und nach 10 min Inkubation bei 360 nm im Absorptionsspektrometer bei 260 nm gemessen. Diese Phosphateichgerade wurde auch unter Zugabe von 0,1 mM Oleoyl-CoA und ohne MgCl_2 aufgenommen. Anhand der in Abb. 14 ermittelten Geradensteigung wurde aus den in den ATPase Messungen ermittelten Absorptionsanstiegen, die ATP-Hydrolyserate (nmol P_i /min) berechnet.

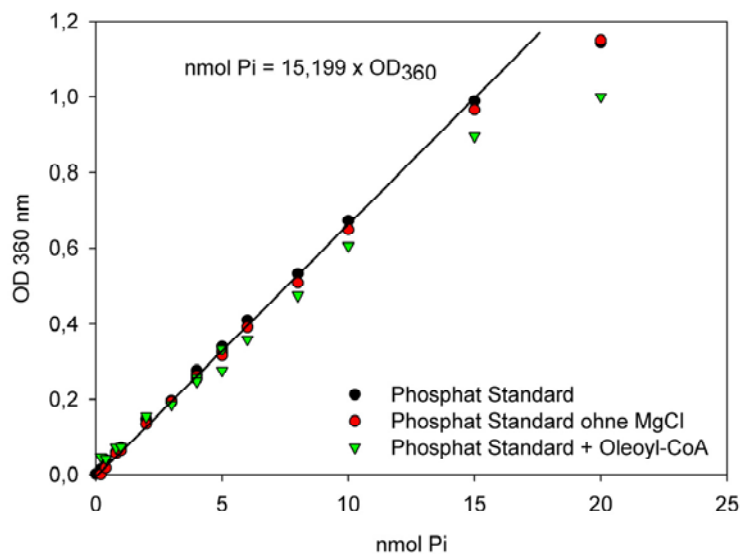


Abb. 14: Phosphateichgerade (für Details siehe Text).

3.6.9 Synthese und Aufreinigung der SL-Fettsäure-CoA Thioester

16-Doxyl-Stearinsäure (Aldrich 253596) und die von Dr. Anne-Katrin Windeck über einen neuen Syntheseprozess synthetisierte 16-Doxyl-Ölsäure (unpubliziert) wurden, wie bei Kawaguchi beschrieben [43] mit Coenzym A Hydrat (Sigma C4282) zum Fettsäure-CoA Ester umgesetzt. Dazu wurde 1,4 mg der SL-Fettsäure und 0,97 mg Carbonyldiimidazol in 0,2 ml THF (wasserfrei) gelöst und 30 min bei RT unter Rühren inkubiert. Um den Zutritt von Wasser zu verhindern, wurde ein Trockenrohr auf das Reaktionsgefäß aufgesetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig abrotiert und der Rückstand in 210 µl THF/H₂O (2:1) in einer Stickstoffatmosphäre gelöst. 3,8 mg Coenzym A wurde in 510 µl THF/H₂O (2:1) gelöst und zum Reaktionsansatz dazugegeben, bevor mit NaOH der pH-Wert auf 7 – 7,5 eingestellt wurde. Die Reaktion wurde 4h bei RT unter Rühren in einer Stickstoffatmosphäre inkubiert, anschließend wurden die Acyl-CoA Ester aus dem Reaktionsgemisch aufgereinigt.

Für analytische Zwecke wurden die Fettsäure-CoA Thioester aus dem Reaktionsgemisch mittels semipräparativer HPLC auf einer Eurospher 100 C₈-RP-Säule (Knaur I6Y529) mit einem Acetonitril/Ammoniumacetatpuffer Gradienten wie bei Kasuya *et al.* beschrieben aufgereinigt [42]. Die präparative Aufreinigung wurde wie bei Pullman beschrieben mittels Dünnschichtchromatographie auf einer Zellulosematrix mit Fluoreszenzmarker (Merck 1.05574) durchgeführt [62]. Die Banden wurden unter UV-Licht (366 nm) detektiert, markiert und von der Platte abgeschabt. Die Fettsäure-CoA Thioester wurden mit Acetonitril/H₂O (1:1) von der Zellulose extrahiert. Die Konzentration der SL-Fettsäure Analoga wurde ESR-spektroskopisch ermittelt. Dazu wurden die Spektren der Lösungen mit unbekannter Konzentration und Vergleichsspektren einer TEMPO-Lösung (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy; Sigma T7263) mit bekannter Konzentration aufgenommen. Durch Integration der Peaks des TEMPO Referenzspektrums mit der Software WinEPR von Bruker wurden die Peakflächen ermittelt und in Bezug zur Konzentration gesetzt. Die Peaks der unbekannten Konzentrationen wurden ebenfalls integriert und die Konzentration aus dem Verhältnis zur Referenzsubstanz ermittelt.

Untersuchung der biologischen Aktivität

Zur Untersuchung, ob die paramagnetische Doxylgruppe in C₁₆-Position der Ölsäure die biologische Aktivität von SL-Oleoyle-CoA beeinflusst, wurden zwei verschiedene Untersuchungen angewendet. Es wurde eine Messung der stimulierten ATPase Aktivität von SL-Oleoyle-CoA im Vergleich zu unmarkiertem Oleoyle-CoA wie unter 3.6.8 beschrieben durchgeführt und die Nutzung als Substrat durch die Acyl-CoA Oxidase aus *Candida sp.* wurde untersucht. Bei der Acyl-CoA Oxidase Reaktion handelt es sich um den ersten Schritt der peroxisomalen β -Oxidation von Hefen.

Acyl-CoA Oxidase Messung

Die Acyl-CoA Oxidase Messungen erfolgten nach dem in Abb. 15 skizzierten Reaktionsschema und wurden von Michael Schneider durchgeführt. Bei der Acyl-CoA Oxidase Reaktion wird eine Doppelbindung in die Coenzym A aktivierte Fettsäure eingeführt und die dabei frei werdenden Wasserstoffatome auf ein Sauerstoffmolekül übertragen. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid, wird in einem zweiten Reaktionsschritt, der zur Bildung eines Quinoneiminfarbstoffes führt, photometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm nachgewiesen. Die Acyl-CoA Oxidase Messung mit SL-Oleoyle-CoA und unmarkiertem Oleoyle-CoA wurde von Michael Schneider weitgehend wie bei Shimizu beschrieben durchgeführt [81], anstelle von Phenol wurde p-Hydroxybenzoesäure ver-

wendet. Die Messung wurde mit 0,002% und 0,004% SL-Oleoyl-CoA bzw. Oleoyl-CoA und zur Kontrolle ohne Substrat durchgeführt.

Reagenzien

A	50 mM	MES-Puffer pH 8,0
B	1,6 mM	4-Aminoantipyrin
	22 mM	p-Hydroxybenzoesäure in A
C	1000 U/ml	Meerrettich-Peroxidase (Typ VI-A, Sigma P 6782) in A
D	5 % (v/v)	Triton X-100 in H ₂ O
E	0,3 U/ml	Acyl-CoA-Oxidase (Sigma A 2903 aus <i>Candida sp.</i>) in A

Arbeitslösung

Die Reagenzien A, B und C werden im Verhältnis 99:100:1 gemischt.

Reaktionscocktail

100 µl	Arbeitslösung
2 µl	Reagenz D
3,33 µl	Reagenz E

Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl einer Fettsäure-CoA Verdünnung (0,024% und 0,046%ig) bzw. 10 µl Wasser als Kontrolle gestartet. Die Bildung des Farbstoffes wurde für eine Stunde bei 500 nm und 30 °C im Plattenlesegerät gemessen.

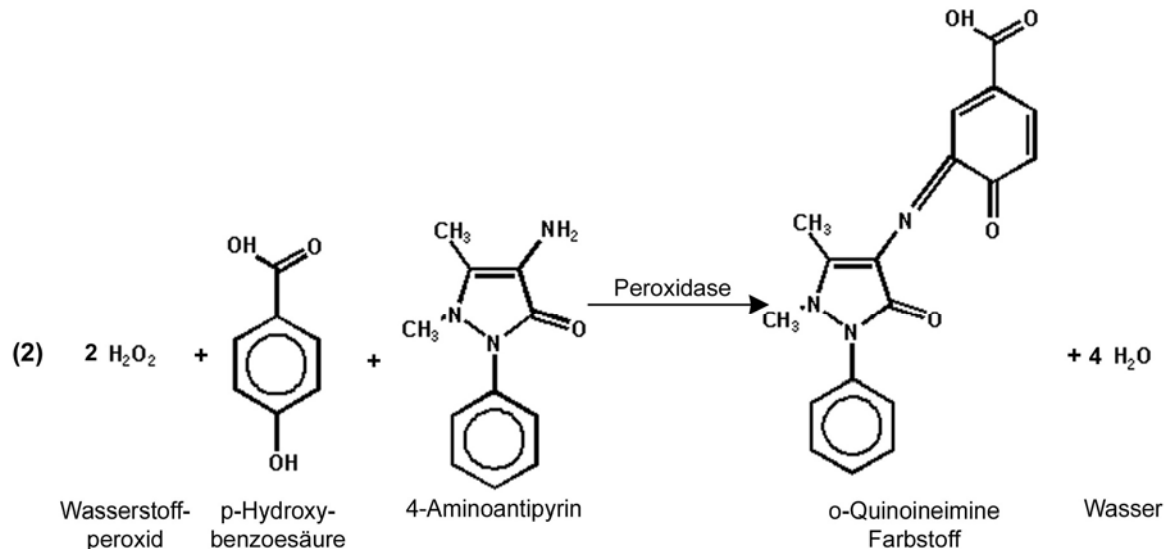


Abb. 15: Reaktionsschema der Acyl-CoA Oxidase Reaktion. (1) Die Acyl-CoA Oxidase fügt eine Doppelbindung in den Acyl-CoA Thioester ein, die frei werdenden Wasserstoffatome werden auf Sauerstoff übertragen und es entsteht Wasserstoffperoxid. (2) Die Peroxidase im Reaktionsmix verknüpft p-Hydroxybenzoesäure und 4Aminoantipyrin in einer Oxidationsreaktion, bei der ein roter o-Quinoineimine Farbstoff entsteht, der bei 500 nm detektiert werden kann. Die frei werdenden Wasserstoffatome werden auf Wasserstoffperoxid übertragen, wobei Wasser frei wird.

3.6.10 Herstellung proteinfreier symmetrisch markierter Vesikel

Symmetrisch markierte Ei-PC LUVs (large unilamellar vesicles) wurden hergestellt, indem 0,5 μmol Ei-PC aus einer Chloroform Stammlösung mit 2 - 4mol% SL-Fettsäureanaloga in THF/Wasser (1:1) versetzt wurde. Das Lösungsmittel wurde unter einem Stickstoffstrom abgedampft und der Lipidfilm wurde in 500 μl Puffer (5 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl) aufgenommen. Die Lösung wurde kräftig gevortexed, bis sich der Lipidfilm vollständig vom Gefäß löste. Die Lösung wurde fünf Gefrier/Tau Zyklen unterworfen, d.h. für 10 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und für 5 min bei $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Lipidsuspension zehnmal unter Druck (N_2) durch eine Polycarbonatmembran (Millipore) mit einer Porengröße von 100 nm extrudiert.

3.6.11 ESR-spektroskopische Untersuchung der Transversalbewegung der Fettsäureanaloga in Modellmembranen

Bei der Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) handelt es sich um eine spektroskopische Methode, die magnetische Felder und niedrigerenergetische Mikrowellen verwendet, um paramagnetische Moleküle mit ungepaarten Elektronen, wie z.B. das stabile Nitroxylradikal der Doxylgruppe, zu detektieren. Sie basiert darauf, dass Elektronen sich wegen ihres Spins wie kleine Magneten verhalten und in einem magnetischen Feld durch Mikrowellen gedreht werden können. Daraus lassen sich Informationen über Molekülstrukturen und Elektronenverteilungen ableiten. Da natürliche Fettsäuren keine ungepaarten Elektronen besitzen, wurde eine Ölsäure bzw. Oleoyl-CoA

mit einer paramagnetischen Doxylgruppe, dem sog. Spin-Label, am Ende der Fettsäure (C₁₆) synthetisiert. Die ESR ermöglicht neben der Detektion der Signalstärke Rückschlüsse auf die lokale Beweglichkeit des Labels in Biomolekülen, was die Beurteilung der Umgebung der Fettsäureanaloge erlaubt. So ist die Beweglichkeit in wässrigen Lösungen deutlich größer als in Modellmembranen, was Rückschlüsse auf die Einbaurate der Fettsäureanaloge zulässt.

Die ESR-spektroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Bruker ECS 106 Spektrometer (Bruker, Karlsruhe) durchgeführt. Alle Spektren wurden bei RT aufgenommen und mit der Bruker EMX Software analysiert. Die Messparameter waren folgende: Modulationsamplitude 2 Gauss und Scanbreite 50 Gauss.

Um Rückschlüsse auf die Transversalbewegung der Fettsäureanaloge in Membranen zu ziehen, wurde eine kombinierte BSA und Ascorbinsäure Reduktion durchgeführt. Die markierte Sonde kann sich abhängig von der Vesikelpräparation (symmetrische oder unsymmetrische Markierung) und der Beweglichkeit zwischen den Membranschichten in der äußeren oder der inneren Membranschicht aufhalten. Durch Extraktion der Fettsäureanaloge mit BSA aus der äußeren Schicht und gleichzeitiger Reduktion des Signals durch Ascorbinsäure kann auf den Anteil der Sonde geschlossen werden, der sich in der äußeren Schicht befindet. Bei symmetrischer Markierung und unbeweglicher Sonde müsste somit ~50% des Signal gelöscht werden, während bei beweglicher Sonde mehr gelöscht werden kann, da sich die Sonde abhängig von der uni- oder bidirektionalen Beweglichkeit zwischen den Membranschichten bewegt. Bei unsymmetrischer Markierung der Vesikel von außen wird bei unbeweglicher Sonde das Signal vollständig gelöscht, ebenso wie bei einer schnell beweglichen Sonde, die bidirektionalen freien Flip-flop ausführt. Ein geschützter Pool im Innern kann nur bei unidirektionaler Bewegung zur inneren Schicht entstehen.

Von den markierten Vesikeln wurde zunächst ein initiales Signal aufgenommen, dann wurden die Proben mit 16,6 mM Ascorbinsäure und 2% (w/v) BSA (hochrein, frei von Fettsäuren) versetzt und weitere Spektren über 15 min in möglichst kurzen Intervallen aufgenommen. In Abb. 16 ist das Reaktionsschema, das zur Löschung des Signals führt, skizziert.

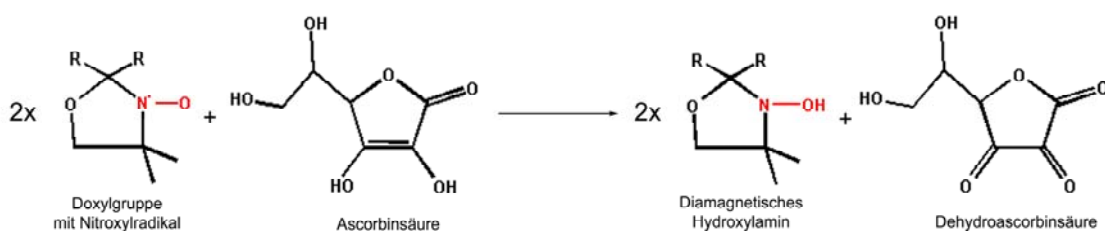


Abb. 16: Reduktion des Nitroxylradikals mit Ascorbinsäure.

Die Auswertung der Reduktionskinetiken erfolgte durch die Messung der Intensität des Tieffeldpeaks. Bei Proben mit einem Anteil von nicht eingebautem Label, wurde dieser Anteil vom Spektrum vor der Analyse subtrahiert. Die Intensitäten wurden normiert, indem die initiale Signalintensität zu 100% gesetzt wurde. Die normierten Signalintensitäten wurden als Funktion der Zeit aufgetragen und unter Verwendung von Gleichung 5 angepasst. Zur Quantifizierung der Transversalbewegung wurde die Signalintensität 2 min nach Zugabe von Ascorbinsäure ausgewertet.

$$y = y_0 + ae^{bx} - cx \quad (\text{Gl. 5})$$

a, b, c : Konstanten

ae^{bx} : beschreibt den exponentiellen Abfall; und $-cx$ den linearen Abfall

y : Intensität

y_0 : Anfangsintensität für $t=0$

x : Zeit

3.6.12 Rekonstitution von Pxa1p-Pxa2p in Proteoliposomen

Für die Rekonstitution von DDM solubilisiertem Pxa1p-Pxa2p aus der FLAG-Fusionsprotein Affinitätsaufreinigung (siehe 3.6.5) in Ei-PC Vesikel wurde 4,5 μmol Ei-PC aus einer Chloroform Stammlösung unter Stickstoff abgedampft. Der Lipidfilm wurde in 500 μl Tris/KCl-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM KCl) mit 15,3 μmol DDM [68] resuspendiert und 4 h bei RT rotierend inkubiert. Zur Phospholipid/DDM-Lösung wurde aufgereinigtes Pxa1p-Pxa2p in unterschiedlichen Volumina und Konzentrationen gegeben. Das Volumen der Lösung wurde mit Tris/KCl-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Zum Detergensentzug wurden die Rekonstitutionsansätze mit 500 μg gewaschenen BioBeads (siehe 3.6.3) über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert [65]. Anschließend wurde der Überstand von den BioBeads abgenommen und die BioBeads mit 1 ml Tris/KCl-Puffer gespült. Die Lösungen wurden vereinigt und auf 8 ml mit Tris/KCl-Puffer aufgefüllt. Die Vesikel wurden durch Zentrifugation geerntet (UZ, Rotor 70.1Ti, 200.000 x g, 50 min, 4 °C) und anschließend in 500 μl Tris/KCl-Puffer resuspendiert und mit einem 1 ml Potter-Homogenisator mit eng sitzendem Stempel homogenisiert. Die Vesikel wurden entweder gleich verwendet oder sie wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75 °C gelagert.

3.6.13 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden nach der Bradfordmethode mit dem Reagenz RotiNanoquant (Carl Roth KG; K880.1) nach Herstellerangaben durchgeführt und im Absorptionsspektrophotometer UV1 von Thermo gemessen.

Für genauere Messungen auch bei sehr niedrigen Konzentrationen wurde das micro BCA Protein Assay Kit von Pierce verwendet. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde in beiden Messmethoden BSA als Proteinstandard verwendet. Für Proteinkonzentrationsbestimmungen in Lösungen, die störende Komponenten wie Saccharose oder Detergenzien enthielten, wurde vor der micro BCA Methode eine TCA/DOC Fällung durchgeführt. Dazu wurden die Proben und die Standards mit 1/10 Volumen DOC Lösung (Natriumdeoxycholat 1,5 mg/ml) versetzt, gevortexed und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1/10 Volumen 72% Trichloressigsäurelösung (TCA) versetzt, weitere 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit in der Eppendorfzentrifuge bei RT zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und verworfen und die Proteinpräzipitate wurde in jeweils 150 μl Wasser resuspendiert. Die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Absorption der Proben wurde in Mikrotiterplatten (Greiner Cellstar) bei 540 nm im Plattenlesegerät FLUOstar Optima bestimmt.

3.6.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [45] in dem „Mini-Protean“ System von BioRad eingesetzt. Die Proben wurden 1:5 mit SDS-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Bei der Analytik löslicher Proteine wurden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert, bei Membranproteinen wurde auf diesen Schritt verzichtet. Die Trenngele hatten, sofern nicht anders angegeben, eine Polyacrylamidkonzentration von 12%. Die Elektrophorese wurde für ca. 20 min bei einer Spannung von 100 V und anschließend für weitere 45 min bei einer Spannung von 200 V durchgeführt. Die Proteinbanden wurden anschließend mittels Coomassie-Blau oder Silberfärbung visualisiert oder die Proteine wurden zur Immunodetektion auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Als Molekulargewichts-Standard wurde der „Dual Color“ oder der „All Blue-Marker“ (BioRad) benutzt. Beide Marker sind vorgefärbt und enthalten Proteine mit den Molekulargewichten 200, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa.

Färbung von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Gele für mindestens 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Coomassie-Blau Färbung kann Proteine bis zu einer Konzentration von ~0,1 µg sichtbar machen. Zur Entfernung nicht gebundenen Farbstoffs wurden die Gele für mindestens 2 h in 10% Essigsäure gewaschen. Danach wurden die Gele digitalisiert oder zwischen Cellophanfolien getrocknet.

Silberfärbung von Proteingelen

Zur Visualisierung sehr geringer Proteinkonzentrationen in den Gelen wurde eine Silbernitratfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Gele zuerst in 50% Methanol, 12% Essigsäure und 0,019% Formaldehyd für 1 h bei RT fixiert. Anschließend wurden die Gele dreimal für 20 min in 50% Ethanol gewaschen und 1 min mit 0,02% Natriumdithionit vorbehandelt. Nach gründlichem Spülen mit H₂O (3 x 20 s) wurden die Gele in 0,2% Silbernitrat und 0,028% Formaldehyd für 20 min imprägniert. Nach erneutem Spülen mit H₂O (2 x 20 s) wurden die Gele in 6% Natriumcarbonat, 0,019% Formaldehyd und 4 mg/ml Natriumdithionit entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Silberfärbung kann Proteine bis zu einer Konzentration von ~0,2 ng sichtbar machen. Nach Waschen mit H₂O (2 x 2 min) wurden die Gele mit 50% Methanol und 12% Essigsäure für 10 min fixiert. Nach abschließendem Schwenken für 15 min in H₂O wurden die Gele digitalisiert oder getrocknet.

3.6.15 Western-blotting und Immunodetektion

Der Transfer der mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine „Hybond“ Nitrozellulose-Membran (GE-Healthcare) erfolgte in einer Semi-Dry Blotting Apparatur (BioRad). Das Trenngel wurde auf eine mit Transferpuffer befeuchtete Nitrozellulose-Membran gelegt. Beide Lagen wurden zwischen zwei Schichten in Transferpuffer getränktem Blot-Papier eingebettet und zwischen Kathode und Anode der Semi-Dry Apparatur angeordnet. Der Proteintransfer erfolgte für 45 min bei einer Spannung von 20 V. Um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran anschließend für 1 h in PBS-Puffer mit 3% (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Die darauffolgende Immunodetektion erfolgte mittels Inkubation mit einem entsprechenden primären Antikörper (3.3.5) und anschließend durch Inkubation mit einem sekundären Antikörper mit gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (anti-Kaninchen-IgG oder anti-Maus-IgG) unter Verwendung des ECL plus

Western-blotting Detektionssystem (GE-Healthcare). Die Detektion der Chemielumineszenz erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, GE-Healthcare). Zur Entwicklung des Filmes wurden Fotochemikalien der Fa. Adefo (Nürnberg) verwendet.

3.6.16 Allgemeine Methoden

Die unten aufgeführten Methoden wurden nach Sambrook *et al.* oder nach Ausubel *et al.* durchgeführt und werden im folgenden nicht näher erläutert [4, 71].

- Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* Zellen
- Herstellung und Transformation kompetenter *S. cerevisiae* Zellen
- Agarose-Gelelektrophorese von DNA

4 Ergebnisse

4.1 Anreicherung peroxisomaler Membranen

Zur Untersuchung der peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p in ihrer nativen Umgebung wurden peroxisomale Membranen aufgereinigt. Diese Membranen sollten für Untersuchungen der ATPase Aktivität verwendet, und die solubilisierten peroxisomalen Membranproteine in Proteoliposomen rekonstituiert werden, um die Transversalbewegung potenzieller Substrate der peroxisomalen ABC-Transporter zu untersuchen. Peroxisomen sind instabil und lassen sich, anders als z.B. Mitochondrien, nicht oder nur unzureichend als intakte Organellen aufreinigen [86]. Aus diesem Grund konnten Untersuchungen nicht direkt an präparierten Peroxisomen durchgeführt werden. Die Aufreinigung wurde dadurch erschwert, dass die peroxisomalen Membranen eine wenig homogene Membranfraktion aus perforierten Peroxisomen und unterschiedlich großen Membranfragmenten bilden. Die Anreicherung peroxisomaler Membranen mit gleichzeitiger Trennung von anderen Zellkomponenten wurde durch eine differenzielle Zentrifugation mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation bewerkstelligt. Die Abtrennung der Zellkerne, Plasmamembranen, ER und Golgi-Apparat geschah zum überwiegenden Teil durch die differenzielle Zentrifugation, da sie leichter sedimentieren. Die größte Schwierigkeit bestand darin, Mitochondrien im Dichtegradienten abzutrennen, da sie eine ähnliche Dichte haben wie Peroxisomen. Die Abtrennung der Mitochondrien war für weitere Untersuchungen auch deshalb besonders wichtig, da sie als „Kraftwerke der Zelle“ eine Vielzahl von ATP-Synthasen und ATPasen enthalten, die bei der Untersuchung der ATPase Aktivität peroxisomaler ABC-Transporter stören.

Peroxisomale Membranen aus dem proteasedefizienten WT-Stamm BJ1991 ohne Mutationen in den *PXA1* und *PXA2* Genen und aus den *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Mutanten wurden nach Kultivierung der Zellen unter Ölsäureinduktion in einem linearen Nycodenz-Dichtegradienten aufgereinigt (siehe 3.6.1). Die Untersuchung der Verteilung peroxisomaler und mitochondrialer Markerproteine im Dichtegradienten erfolgte im Western-blot durch immunologischen Nachweis und anhand der Aktivitäten von Markerenzymen.

Zum immunologischen Nachweis von peroxisomalen bzw. mitochondrialen Markerproteinen in den Gradientenfraktionen wurden spezifische Antikörper gegen das membranassoziierte peroxisomale Protein Pcs60p und das mitochondriale Protein der inneren Mitochondrienmembran Aac2p verwendet. Das Ergebnis einer Aufreinigung aus dem WT-Stamm BJ1991 ist in Abb. 17 dargestellt.

Zur enzymatischen Analyse der Gradientenfraktionen wurde die Katalaseaktivität als peroxisomaler Marker und die Aktivität der Citrasythase (siehe 3.6.1) als mitochondrialer Marker genutzt. Im Diagramm sind neben den Enzymaktivitäten die Nycodenzkonzentration und die Proteinkonzentration in den Gradientenfraktionen abgebildet. Die Maxima der peroxisomalen und der mitochondrialen Fraktionen waren gegeneinander verschoben, da die peroxisomalen Membranen eine etwas höhere spezifische Dichte haben und weiter in den Nycodenz-Dichtegradienten einwandern. Die am höchsten konzentrierten peroxisomalen Membranfraktionen mit der höchsten Katalaseaktivität und den stärksten Pcs60p Signalen fanden sich in den Fraktionen 12 – 14 und die dichtesten mitochondrialen Proben waren die Fraktionen 7 – 10. Die Gesamtheit der konzentrierten mitochondrialen Fraktionen erstreckte sich jedoch über die Fraktionen 4 - 13, so dass die hochkonzentrierten peroxisomalen Fraktionen nicht ausreichend von Mitochondrien getrennt werden konnten und nur die geringer konzentrierten Fraktionen 14 – 17 für weitere Untersuchungen ausreichend von Mitochondrien separiert waren. Wie aus der Abbildung ebenfalls erkennbar ist, sank die Proteinkonzentration mit zunehmender Migration im Gradienten stark, so dass die Ausbeute in den Fraktionen 14 - 17 nur noch ca. 70 µg/ml betrug.

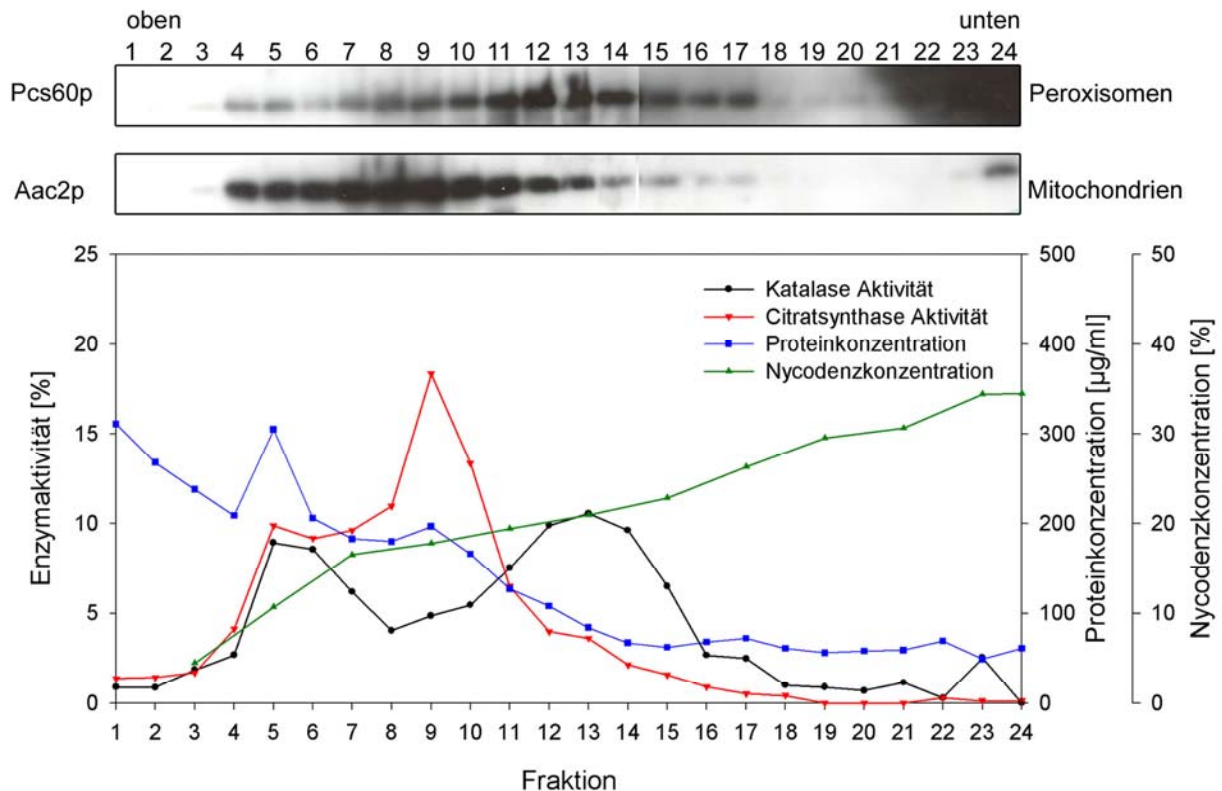


Abb. 17: Charakterisierung der Anreicherung peroxisomaler Membranfraktionen aus Wildtyp-Zellen in einem 10 - 40%igen Nycodenz-Dichtegradienten. Die Migration der Peroxisomen und der Mitochondrien im Dichtegradienten wurde analysiert durch den immunologischen Nachweis des peroxisomalen Markerproteins Pcs60p und des mitochondrialen Markerproteins Aac2p mittels spezifischer Antikörper im Western-blot und anhand der Aktivität der Markerenzyme Katalase (Peroxisomen) und Citratsynthase (Mitochondrien), der Gesamteproteinkonzentration und der Nycodenz-Dichteverteilung in den Fraktionen des Dichtegradienten.

Als Negativkontrolle für nachfolgende Untersuchungen wurden unter denselben Bedingungen *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Deletionsmutanten kultiviert und aufgereinigt. Die Anreicherung peroxisomaler Membranen aus den Deletionsmutanten ergab trotz des reduzierten Ölsäurekatabolismus keinen signifikanten Unterschied bei der Anreicherung peroxisomaler Membranen gegenüber dem WT Stamm (Daten nicht gezeigt).

Voraussetzung für die weitere Charakterisierung der peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p war die Trennung der peroxisomalen Membranen von anderen Organellen. Wie in Abb. 17 zu sehen ist, ist dies nicht in ausreichender Effizienz gelungen. Die Enzymaktivitäten und die immunologisch detektierten Markerproteine hatten zwar versetzte Maxima, jedoch einen größeren überlappenden Bereich, in dem die peroxisomalen Fraktionen nicht ausreichend von Mitochondrien separiert wurden (Fraktion 8 – 13). Ausreichend separierte Proben fanden sich in den Fraktion 14 - 17. In diesem Bereich sank jedoch die Proteinkonzentration, so dass eine Aufreinigung zwar möglich, die Ausbeute jedoch sehr gering war.

4.1.1 Untersuchung der Substratstabilität potenzieller Substrate

Genetische und biochemische Untersuchungen der peroxisomalen ABC-Transporter von *S. cerevisiae* ergaben Hinweise darauf, dass Coenzym A aktivierte langkettige Fettsäuren das Substrat der peroxisomalen ABC-Transporter sein könnten. Da Peroxisomen auch der Ort der β -Oxidation sind, dem enzymatischen Abbau von Acyl-CoA zur Energiegewinnung, wurde zunächst die Stabilität von Lauroyl-CoA und Oleoyl-CoA bei Inkubation mit angereicherten peroxisomalen Membranen untersucht. Die Stabilität des Substrats innerhalb des Mess-

zeitraums war Voraussetzung für weitere Untersuchungen wie die Transversalbewegung aktivierter Fettsäuren über Biomembranen. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 18 gezeigt.

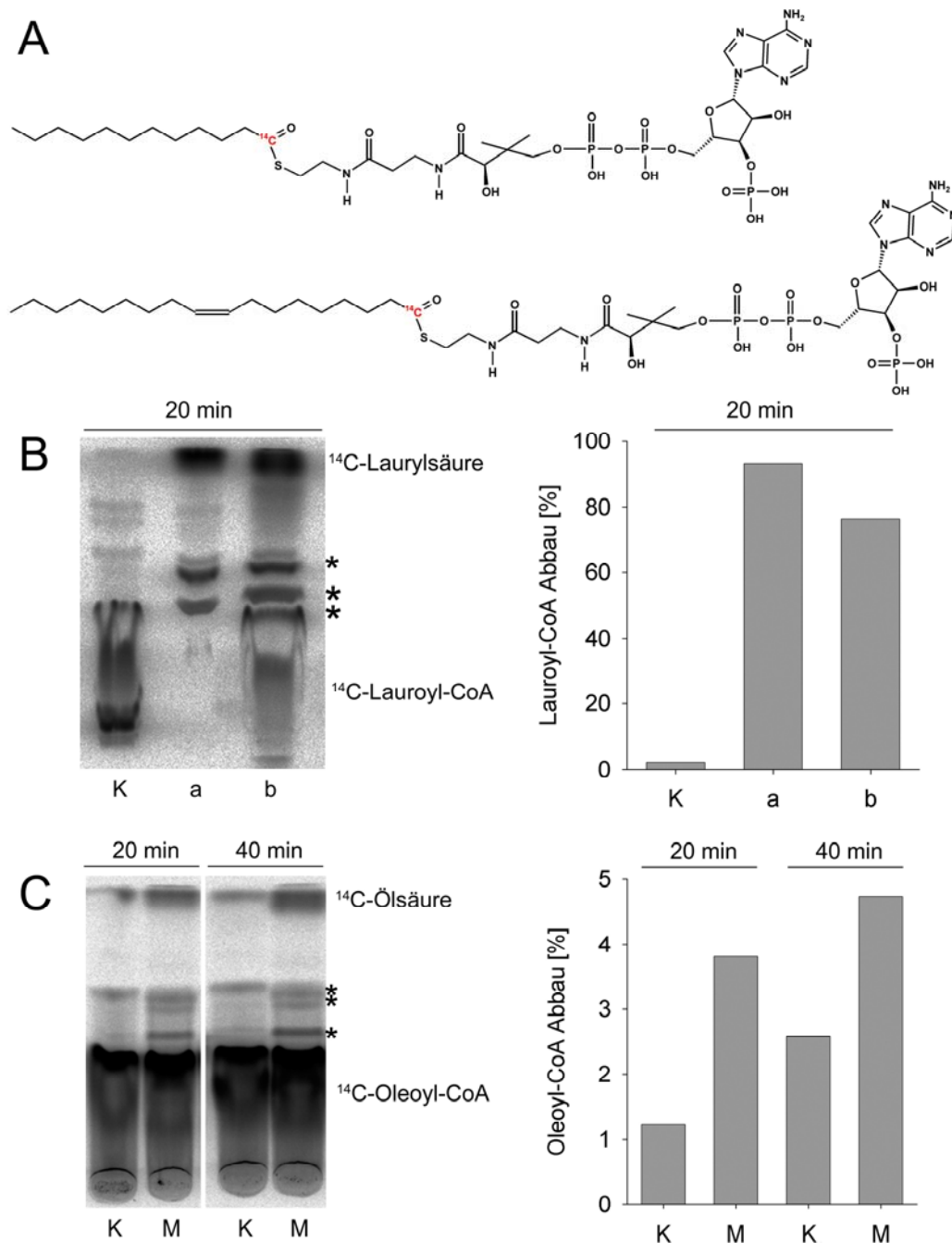


Abb. 18: Untersuchung der Substratstabilität von ^{14}C -Lauroyl- und ^{14}C -Oleoyl-CoA nach Inkubation bei 18°C mit angereicherten peroxisomalen Membranen. (A) Strukturformel der radioaktiv markierten Fettsäureanaloge, rot markiert ist das ^{14}C Nuklid. (B) DC von Lauroyl-CoA, autoradiographisch mit dem Phosphorimager detektiert. Je 250 nCi ^{14}C -Lauroyl-CoA wurde 20 min ohne und in Gegenwart von angereicherten peroxisomalen Membranen inkubiert. K = Kontrolle ohne peroxisomale Membranen, a = mit in Hochsalzpuffer gewaschenen Membranen, b = mit in TE-Puffer gewaschenen Membranen. Das Ausgangsprodukt Lauroyl-CoA und die freie Laurylsäure sind beschriftet, unbekannte distinkte Abbauprodukte sind mit Sternen (*) gekennzeichnet. Das Diagramm zeigt eine Quantifizierung der Abbauprodukte, der Abbau beträgt bei a = 93% und bei b = 76%. (C) DC von Oleoyl-CoA. Je 250 nCi ^{14}C -Oleoyl-CoA wurden 20 und 40 min ohne und mit in TE-Puffer gewaschenen peroxisomalen Membranen inkubiert. K = Kontrolle ohne Membranen, M = mit peroxisomalen Membranen. Das Ausgangsprodukt Oleoyl-CoA und die freie Ölsäure sind beschriftet, unbekannte distinkte Abbauprodukte sind mit Sternen (*) gekennzeichnet. Das Diagramm zeigt die densitometrisch quantifizierten Abbauprodukte, der Abbau beträgt nach 20 min ~3,8% und nach 40 min 4,7%, damit ist der Abbau deutlich geringer als in (B), aber doppelt so hoch wie bei der Kontrolle.

Das Fettsäurederivat ^{14}C -Oleoyl-CoA wurde verwendet, weil aktivierte Ölsäure auch für spätere Transportmessungen eingesetzt werden sollte und ^{14}C -Lauroyl-CoA wegen der besseren Löslichkeit in wässrigen Lösungen. Abb. 18 Teil (A) zeigt die Strukturformeln der aktivierten Fettsäuren mit Lokalisation des ^{14}C Nuklids. Zur Untersuchung der Stabilität der potenziellen Substrate wurde Lauroyl-CoA bzw. Oleoyl-CoA mit angereicherten peroxisomalen Membranfraktionen inkubiert und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Autoradiographie analysiert. Die peroxisomalen Membranen wurden für die Experimente aus den Nycodenz-Fractionen sedimentiert und in verschiedenen Puffern gewaschen. Für die Inkubation mit Lauroyl-CoA in Abb. 18 Teil (B) wurden die Membranen in EDTA haltigem TE-Puffer und in Puffer mit einer hohen Salzkonzentration gewaschen. Beim Waschen mit Hochsalzpuffer [21] werden membranassoziierte Proteine abgetrennt, es sollten damit auch die meisten Proteine, die an der β -Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind, abgetrennt werden, da es sich dabei überwiegend um lösliche Proteine handelt. Beim Waschen mit EDTA haltigem TE-Puffer werden dagegen zweiwertige Ionen komplexiert und stehen damit Enzymkatalysen nicht mehr zur Verfügung. Beide Proben zeigten bereits nach 20 min einen massiven Substratabbau, wie die densitometrische Quantifizierung mit der AIDA Software ergab. Dabei zeigte die in Hochsalzpuffer gewaschene Membranpräparation mit 93% einen noch stärkeren Abbau, als die in TE-Puffer gewaschene Probe mit 76%. Für die Inkubation mit Oleoyl-CoA in Abb. 18 Teil (C) wurden die Membranen in TE-Puffer gewaschen und 20 und 40 min bei 18 °C inkubiert. Der Abbau war mit 3,8% bzw. 4,7% deutlich geringer als bei der Inkubation mit Lauroyl-CoA in Teil (B), jedoch immer noch doppelt so hoch wie bei der Kontrolle und es waren korrespondierende Abbauprodukte (*) zu verzeichnen, die jedoch nicht näher untersucht wurden. Es ist anzumerken, dass die eingesetzte Membran bzw. Proteinkonzentration in diesen Experimenten nicht näher definiert war, da die geringe Membranausbeute keine Proteinkonzentrationsbestimmung zuließ, d.h. der verringerte Abbau bei Oleoyl-CoA im Vergleich zu Lauroyl-CoA war wahrscheinlich auf eine geringere Membranproteinkonzentration zurückzuführen.

4.1.2 Rekonstitution peroxisomaler Membranproteine

Peroxisomale Membranen hatten sich für direkte Untersuchungen als ungeeignet erwiesen, da die Substratstabilität nicht gewährleistet und keine ATPase Aktivität nachweisbar war. Im rekonstituierten System existieren jedoch andere Bedingungen, da sich dort nur detergenssolubilisierbare Membranproteine einbauen lassen sollten.

Peroxisomale Membranproteine wurden wie unter 3.6.12 beschrieben mit Triton X-100 solubilisiert und in Ei-PC Proteoliposomen rekonstituiert. Um zu prüfen, ob peroxisomale Membranproteine erfolgreich rekonstituiert werden konnten, wurden die Proteoliposomen gefällt und das Sediment in einer SDS-PAGE und einer Immundetektion analysiert, wie in Abb. 19 zu sehen ist.

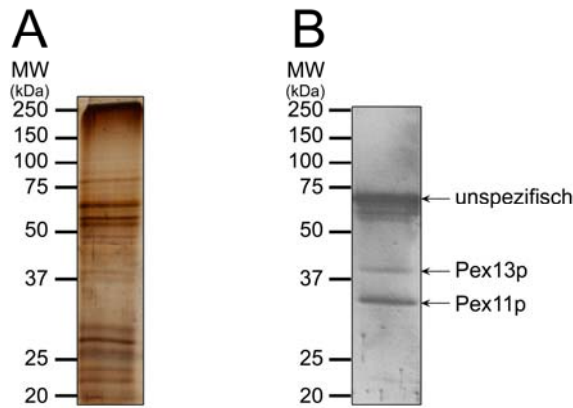


Abb. 19: In Proteoliposomen rekonstituierte peroxisomale Membranproteine. ~0,6 mg peroxisomale Membranproteine aus einer Aufreinigung wurden in Hochsalzpuffer resuspendiert und sedimentiert. Die pelletierten Membranen wurden in TE-Puffer aufgenommen und die Membranproteine mit Triton X-100 solubilisiert und in Ei-PC Vesikel rekonstituiert. (A) SDS-PAGE mit Silberfärbung. (B) Immunodetektion der peroxisomalen Markerproteine Pex11p und Pex13p.

Die SDS-PAGE und die Immunodetektion in Abb. 19 zeigen deutlich, dass es gelungen war, Triton X-100 solubilisierte peroxisomale Membranproteine in Proteoliposomen zu rekonstituieren. Die nachgewiesenen peroxisomalen Markerproteine Pex11p und Pex13p sind integrale Membranproteine. Spezifische Antikörper gegen Pxa1p und Pxa2p gab es zum Versuchszeitpunkt nicht.

Bei der Herstellung der Proteoliposomen wurde zur Untersuchung der Substratstabilität SL-Oleoyl-CoA (siehe 3.6.9) zugegeben und anschließend zusammen mit dem Detergens von den Vesikeln extrahiert. Anschließend wurde die Probe mittels HPLC analysiert. Die HPLC-Spektroskopie wurden wie unter 3.6.9 beschrieben durchgeführt. Das HPLC-Spektrum in Abb. 20 Teil (A) zeigt einen dominanten Peak mit einer Retentionszeit von 23,2 min, der im Kontrollspektrum in Teil (B) nicht vorhanden ist. Im Kontrollspektrum (B) des reinen SL-Oleoyl-CoA ist die Retentionszeit 14,9 min. Im Bereich dieses Peaks ist in (A) nur ein kleiner Peak zu sehen. Der größte Anteil der Probe eluierte von der Säule mit einer Retentionszeit, die in Vergleichsmessungen der freien SL-Ölsäure zugeordnet werden konnte.

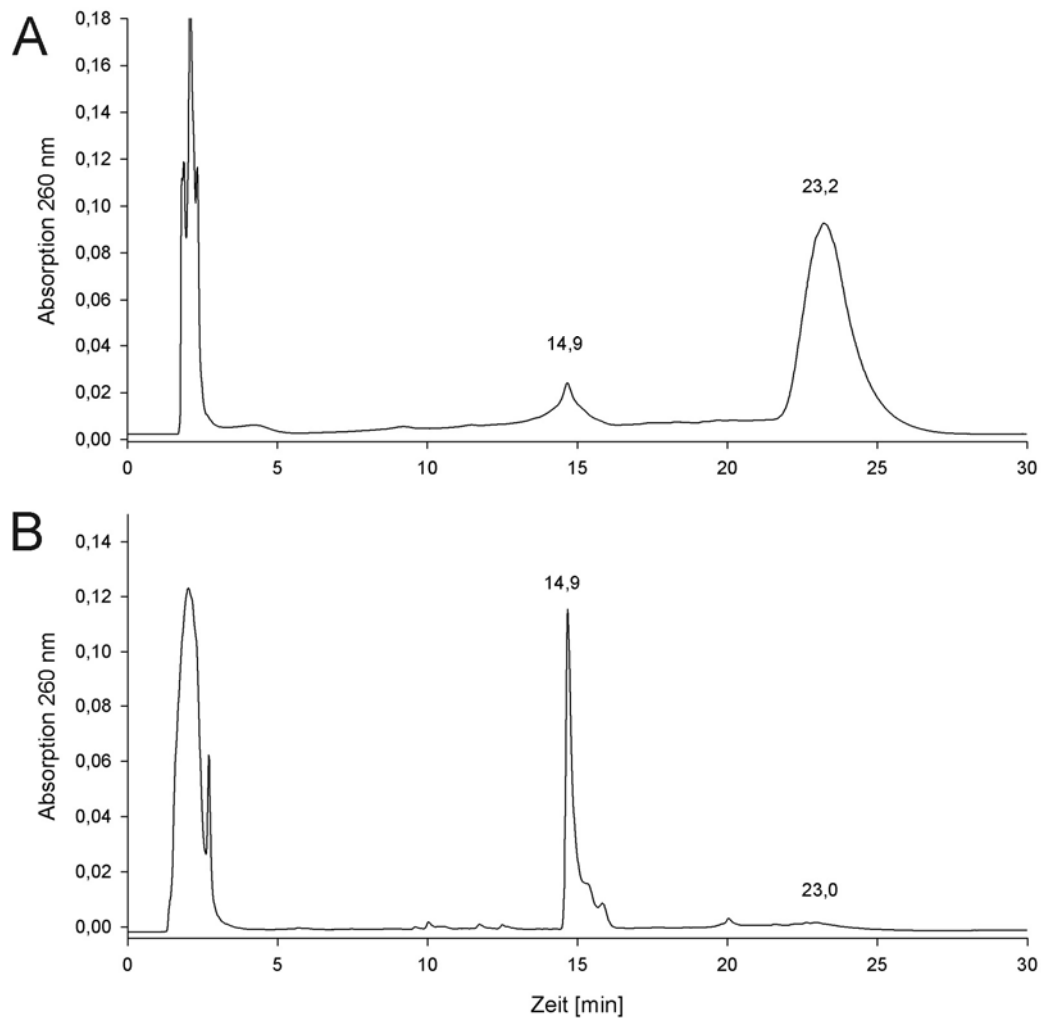


Abb. 20: HPLC-Spektren von SL-Oleoyl-CoA vor und nach Inkubation mit Proteoliposomen aus peroxisomalen Membranproteinen. (A) HPLC Spektrum nach Inkubation mit Proteoliposomen, dominanter Peak mit Retentionszeit $t = 23,2$ min entspricht freier Ölsäure. (B) Kontrollspektrum von SL-Oleoyl-CoA (Retentionszeit $t = 14,9$ min).

Zusammenfassend kann aus den Experimenten mit peroxisomalen Membranen geschlossen werden, dass sie kein geeignetes Ausgangsmaterial für ATPase- und für Transportmessungen darstellten. Neben der nicht ausreichenden Substratstabilität bei Inkubation mit peroxisomalen Membranproteinen gestaltete sich die Isolation peroxisomaler Membranen mit vernünftiger Ausbeute schwierig und es konnte bei angereicherten peroxisomalen Membranen im Gegensatz zu angereicherten Mitochondrien keine ATPase Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt), was wahrscheinlich auf das niedrige Expressionslevel der peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p zurückzuführen ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Versuchskonzept umgestellt, und es sollten epitopmarkierte Versionen der Proteine überexprimiert und aufgereinigt werden.

4.2 Aufreinigung von Pxa1p-Pxa2p

4.2.1 Expressionssysteme

Ölsäure induzierbare Konstrukte mit C-terminaler Epitopmarkierung

Klonierung

Zur homologen Überexpression der peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p und Pxa2p wurden verschiedene Expressionskonstrukte von Michael Schneider in Bochum kloniert. Er benutzte dazu die „Shuttle Vektoren“ pRS414 und pRS416 mit dem starken ölsäureinduzierbaren Promotor *FOX1* und den Selektionsmarkern *TRP1* bzw. *URA3*. In diese Vektoren wurden die cDNAs der „full-length“ ABC-Halbtransporter mit C-terminalem Epitop kloniert. Als Epitop zur Detektion und zur Aufreinigung wurde das (His)₆- bzw. das FLAG-Epitop verwendet. Die verwendeten Vektoren sind unter 3.3.3 aufgeführt.

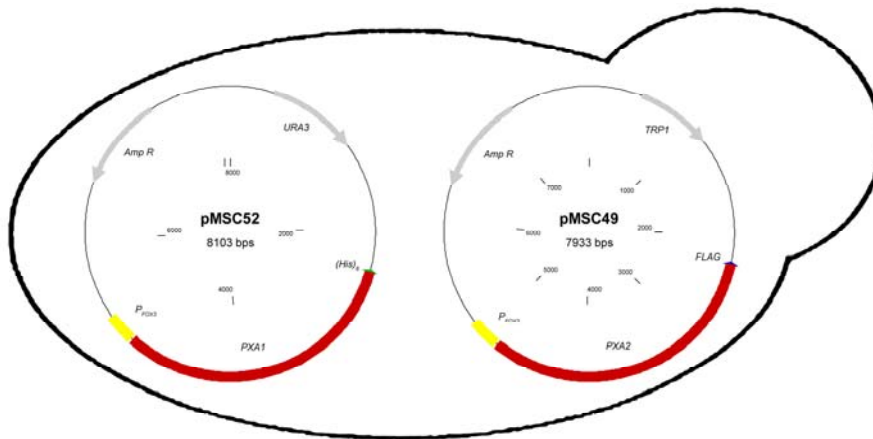


Abb. 21: Schematische Darstellung des vektorbasierten Expressionssystems. Die Vektoren pMSC49 und 52 mit ölsäureinduzierbarem *FOX1* Promotor kodieren für die Proteine Pxa2p mit C-terminalem FLAG Epitop bzw. Pxa1p mit C-terminalem (His)₆ Epitop. Beide Vektoren wurden in den Stamm BJ1991 Δ *pxa1* Δ *pxa2* Δ mit Deletionen in beiden Genen transformiert. Als Selektionsmarker dienen das *URA3* und das *TRP1* Gen. Die Ampicillinresistenz wurde als Selektionsmarker für die Klonierung in *E. coli* verwendet.

Funktionalitätsuntersuchung und Lokalisationsstudien

Die Überprüfung der subzellulären Lokalisation der C-terminal epitopmarkierten peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p und Pxa2p wurde von Michael Schneider durchgeführt. Dazu wurden die Expressionsplasmide in *pxa1* Δ bzw. *pxa2* Δ Einzel- oder Doppelmутanten von BJ1991 transformiert. Aus diesen transformierten Stämmen wurden, wie unter 3.6.1 beschrieben, peroxisomale Membranen aufgereinigt und mittels Western-blot und Immunodetektion analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisationsstudien zeigten, dass die epitopmarkierten Versionen der peroxisomalen ABC-Transporter im Dichtegradienten gleich gewandert sind, wie peroxisomale Markerproteine. Dies war unabhängig davon, ob ein nativer Halbtransporter und sein epitopmarkierter Dimerisierungspartner exprimiert wurden, oder ob beide Halbtransporter mit FLAG- bzw. (His)₆-Epitop im Doppel-„knock-out“ Stamm ohne nativen Hintergrund von Plasmiden exprimiert wurden.

Neben der Lokalisation wurde von Michael Schneider auch die Funktionalität der epitopmarkierten ABC-Halbtransporter untersucht. Dazu wurden verschiedene „knock-out“ Stämme und transformierte Stämme in einer dekadischen Verdünnungsreihe auf Agarplatten mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle „gespottet“ (Abb. 22). Da die β -Oxidation der Hefe ausschließlich in Peroxisomen stattfindet und das normale Wachstum auf Ölsäuremedium von funktionalen ABC-Transportern Pxa1p-Pxa2p abhängt [33], diente der Wachstumstest mit Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle gleichzeitig als Funktionalitätstest der ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p.

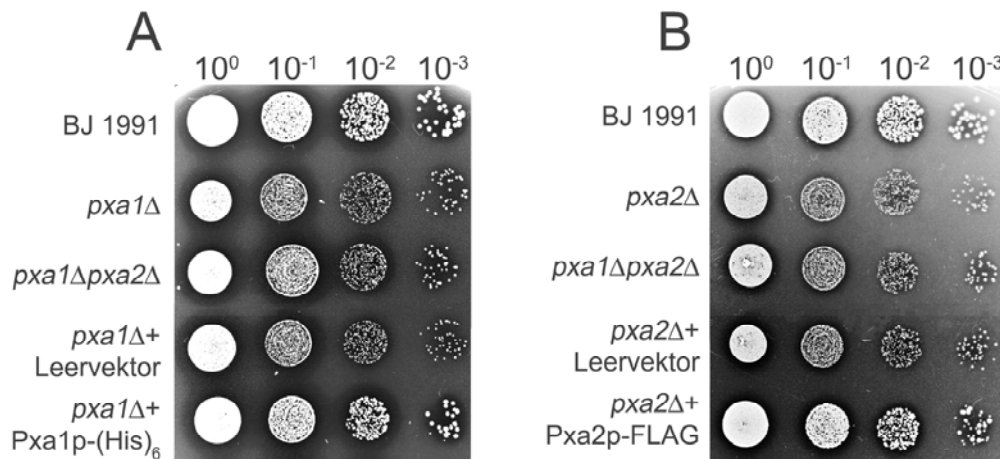


Abb. 22: Wachstumsverhalten auf Agarplatten mit der Kohlenstoffquelle Ölsäure als Komplementationstest der epitopmarkierten Mutanten (A) Pxa1p-(His)₆ und (B) Pxa2p-FLAG. Die angezeigten Stämme wurden in dekadischen Verdünnungen ($10^0 - 10^{-3}$) auf die Platten aufgetropft und für 4 Wochen bei 30 °C inkubiert. Die Koloniegröße und die Halobildung, d.h. die Aufklärung des Mediums durch Entzug der trüben Ölsäure reflektieren die Ölsäurekatabolisierung des Wildtypstamms BJ 1991 und der *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Einfach- und Doppeldeletionsstämme. Vor allem in den beiden höchsten Verdünnungsstufen ($10^{-2} - 10^{-3}$) ist erkennbar, dass die *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Einfach- und Doppeldeletionsstämme verzögertes Wachstumsverhalten zeigen. Durch Expression der C-terminal epitopmarkierten Mutanten Pxa1p-(His)₆ bzw. Pxa2p-FLAG in den Deletionsstämmen konnte der Wildtypphänotyp wieder hergestellt werden.

Der Funktionalitätstest in Abb. 22 zeigt das Wachstumsverhalten der *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Mutantenstämme mit vektorbasierter Expression der entsprechenden C-terminal epitopmarkierten ABC-Halbtransporter Pxa1p-(His)₆ und Pxa2p-FLAG zusammen mit den entsprechenden Kontrollen, d.h. es wurde überprüft, ob die epitopmarkierten Halbtransporter mit ihren nativen Dimerisierungspartnern den Wildtypphänotyp wiederherstellen konnten und Ölsäure als Kohlenstoffquelle mit gleicher Effizienz nutzen konnten wie die Wildtypkontrolle. Dies ist erkennbar an unterschiedlichen Koloniedichten und unterschiedlichen Höfen, die zeigen, ob Ölsäure, die eine Trübung im Medium verursacht, verstoffwechselt wurde. Abb. 22 Teil (A) und Teil (B) zeigen von oben nach unten jeweils die Wildtypkontrolle BJ 1991 mit normalem Wachstumsverhalten, die *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Einzel- und Doppelmutanten mit reduziertem Wachstum, unabhängig davon, ob nur ein Halbtransporter oder beide Halbtransporter mutiert wurden. Das identische Wachstumsverhalten der Einzel- und Doppelmutanten weist drauf hin, dass aktive Transporter Heterodimere sind und dass Homodimere entweder nicht gebildet werden oder inaktiv sind. Als weitere Kontrolle wurde der *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Mutantenstamm mit dem Leervektor transformiert, wodurch wie erwartet keine Verbesserung des Wachstumsverhaltens erzielt werden konnte. Die unterste Reihe zeigt die *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Einzelmutanten transformiert mit dem Expressionsvektor für den mutierten Halbtransporter. Hierbei wurde das Wachstumsverhalten des Wildtyps wiederhergestellt, wodurch die Komple-

mentierung der *pxa1Δ* Mutation durch die vektorbasierte Expression von Pxa1p-(His)₆ und die Komplementierung der *pxa2Δ* Mutation durch die Expression von Pxa2p-FLAG gezeigt werden konnte. Aus der hier gezeigten vollen Funktionalität der C-terminal epitopmarkierten Varianten der ABC-Halbtransporter mit ihren nativen Dimerisierungspartnern kann auf die Bildung funktionaler Volltransporter bei Dimerisierung beider epitopmarkierter Halbtransporter Pxa1p-(His)₆ und Pxa2p-FLAG geschlossen werden.

N-terminal genomisch epitopmarkierter Stamm mit galaktoseinduzierbarem Promotor

Da das Expressionslevel von Pxa1p-Pxa2p im ölsäureinduzierbaren Stamm relativ niedrig war, wurde von Michael Schneider noch ein weiteres Expressionssystem wie bei Longtine *et al.* beschrieben kloniert [50]. Er integrierte in den *S. cerevisiae* WT-Stamm BY4742 die galaktoseinduzierbare Promotorkassette *GAL1* zusammen mit Sequenzen die für das FLAG- bzw. (His)₁₀-Epitop kodieren. Die Promotorkassette wurde mit Primern, die homologe *PXA* flankierende Sequenzen enthielten, durch PCR amplifiziert. Zusätzlich kodierten die *antisense*-Primer noch für das FLAG-Epitop für Pxa1p bzw. das (His)₁₀-Epitop für Pxa2p.

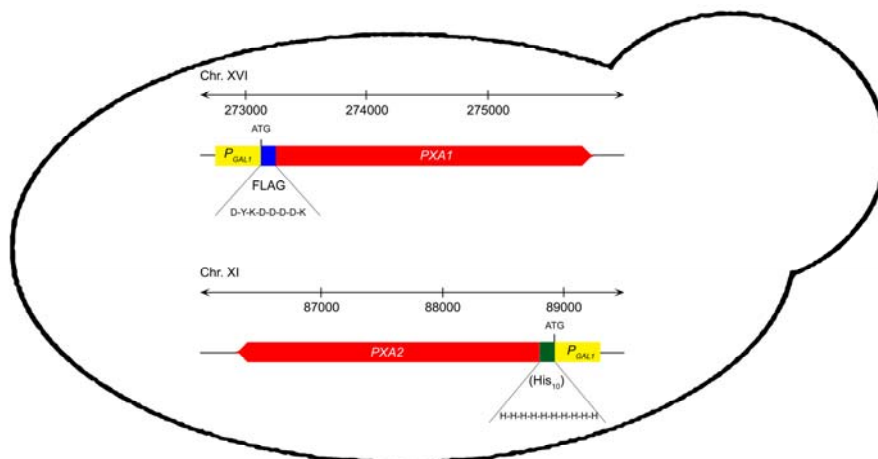


Abb. 23: Schematische Darstellung des Hefestammes BY4742 *P_{Gal1}PXA1 P_{Gal1}PXA2*. Durch homologe Rekombination wurde eine *P_{Gal1}* Kassetten und die kodierende Sequenz für das FLAG bzw. (His)₁₀ Epitop in Chromosom XVI vor dem *PXA1* Gen (273254..275866) und in Chromosom XI vor dem *PXA2* Gen (88791..86230) integriert. Für das FLAG- bzw. (His)₁₀ Epitop sind die Aminosäuresequenzen angegeben. Die Epitope sind nicht maßstabsgetreu skizziert.

Eine Funktionalitätsuntersuchung durch Überprüfung der Ölsäureverstoffwechslung wie für das oben beschriebene ölsäureinduzierbare Expressionssystem mit C-terminaler Epitopmarkierung, war hier nicht durchführbar, da der Stamm für die Pxa1p-Pxa2p Expression Galaktose im Medium benötigt, und somit vor dem Katabolismus der Ölsäure den leichter zugänglichen Zucker verbraucht. Da N-terminal epitopmarkierte Mutanten von Pxa2p mit Haemagglutinin-Epitop in der Literatur bereits ohne Funktionsverlust beschrieben wurden [33, 77], musste nicht davon ausgegangen werden, dass N-terminale FLAG- bzw. (His)₁₀-Epitope zur Inaktivierung führen. Das His-Epitop wurde gegenüber dem vektorbasierten Konstrukt von 6 auf 10 Histidine verlängert, weil mit dem (His)₆-Epitop keine spezifische Bindung an Ni-NTA Agarose erzielt werden konnte.

4.2.2 Generierung spezifischer Antikörper gegen Pxa1p und Pxa2p

Um Pxa1p und Pxa2p in nativer Form ohne Epitopmarkierung nachweisen zu können, wurden spezifische Antikörper gegen Pxa1p und Pxa2p generiert. Als Antigensequenz für Pxa1p wurde, wie bereits publiziert, die letzten 163 AS verwendet [78] und als Sequenz für Pxa2p die Aminosäuren 626-839 [33]. Die Proteinfragmente wurden mit (His)₆-Epitop in *E. coli* exprimiert, unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und in verdünnter Form direkt zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt.

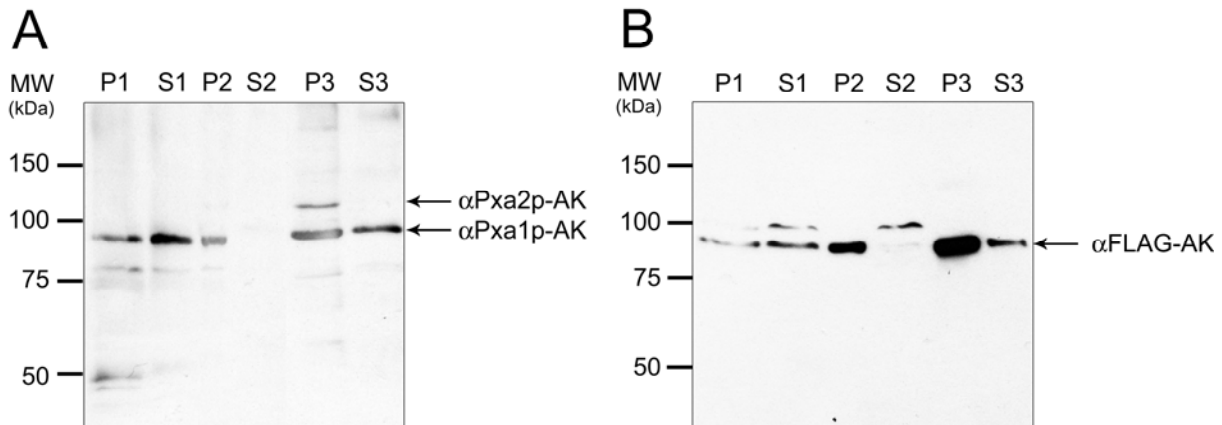


Abb. 24: Test der spezifischen Antiseren gegen Pxa1p und Pxa2p. (A) und (B) zeigen dieselben Proben eines Aufreinigungsexperimentes (Beschriftung wie in Abb. 25 erläutert). (A) Immunodetektion mit αPxa1p- und αPxa2p-Antiserum. (B) Immunodetektion mit αFLAG (M2)-AK.

Der Antikörpertest in Abb. 24 Teil (A) zeigt die Immunodetektion von Proben eines Aufreinigungsexperimentes (siehe 4.2.3) mit den neu generierten Antikörpern gegen Pxa1p und Pxa2p. Zum Vergleich ist in Teil (B) die Immunodetektion derselben Proben mit αFLAG (M2)-AK zu sehen. Das Experiment zeigt, dass beide Antikörper das Protein, gegen das sie generiert wurden, spezifisch erkannten und nur eine geringe unspezifische Hintergrundbindung zeigten. Die Sensitivität des αPxa1p-Antiserums war ähnlich gut wie beim αFLAG (M2)-AK. Die Sensitivität des αPxa2p-Antiserums war dagegen deutlich niedriger, es detektierte nur eine Bande im Solubilisierungsrückstand P3, d.h. der Probe mit dem stärksten αFLAG (M2)-AK Signal in Teil (B).

4.2.3 Aufreinigung der peroxisomalen ABC-Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p

Nachdem für die vektorkodierten C-terminal epitopmarkierten ABC-Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p Funktionalität und korrekte subzelluläre Lokalisation nachgewiesen werden konnte, sollte versucht werden die Halbtransporter unter Ausnutzung der spezifischen Bindung des His- und des FLAG-Epitops an speziell dazu entwickelten Affinitäts-Matrices aufzureinigen.

Die beiden C-terminal epitopmarkierten Halbtransporter Pxa1p-(His)₆ und Pxa2p-FLAG wurden in der *pxa1Δ pxa2Δ* Doppeldeletionsmutante ohne nativen Hintergrund exprimiert. Die Kultivierung erfolgte wie unter 3.6.5 beschrieben in Minimalmedium mit Ölsäureinduktion. Der genomisch N-terminal epitopmarkierte Stamm wurde wie unter 3.6.5 beschrieben in Vollmedium mit Galaktoseinduktion kultiviert.

Die Aufreinigungsexperimente wurden für das vektorkodierte C-terminal epitopmarkierte Expressionssystem mit ölsäureinduzierbarem Promotor und für das genomisch N-terminal epitopmarkierte Expressionssystem mit galaktoseinduzierbarem Promotor nach demselben Schema durchgeführt, das in Abb. 25 skizziert ist.

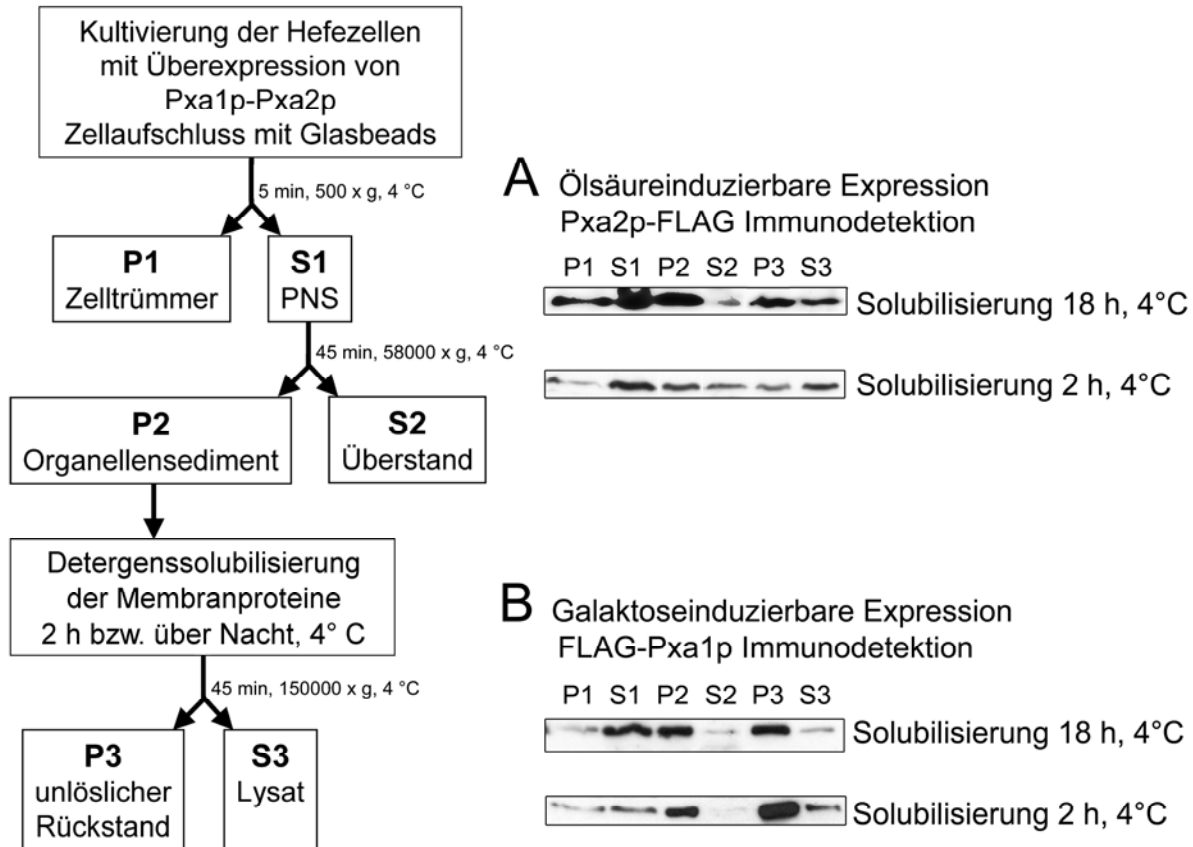


Abb. 25: Prozessschema und Analytik der Pxa1p und Pxa2p Solubilisierung und Aufreinigung. Das Verlaufsschema zeigt und benennt die wichtigsten Zwischenschritte bei der Anreicherung von Organellenmembranen und der Solubilisierung der Membranproteine. Analytik des Prozesses mittels Immunodetektion mit α FLAG (M2)-AK, dazu wurden äquivalente Proben volumina mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Expressionssystem mit ölsäureinduzierbarem Promotor und C-terminaler FLAG-Epitop Markierung von Pxa2p und (B) Expressionssystem mit galaktoseinduzierbarem Promotor und N-terminaler FLAG-Epitop Markierung von Pxa1p. Es sind jeweils zwei Experimente mit kurzer (2 h) und mit langer Solubilisierungsdauer (18 h) der Membranproteine mit 1% DDM gezeigt.

Das Schema in Abb. 25 links skizziert die Prozessschritte bei der Aufreinigung von Pxa1p und Pxa2p von der Kultivierung bis zur Detergenssolubilisierung (siehe 3.6.5). Nach dem Zellaufschluss mit Glasbeads wurden die Zelltrümmer mit den Zellkernen durch Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit abgetrennt. Der Überstand (PNS; post nuclear supernatant) enthält lösliche Proteine und Organellenmembranen, die durch eine hochtourige Zentrifugation voneinander getrennt wurden. Das dabei gewonnene Organellensediment wurde mit Detergens versetzt, um die Membranproteine zu solubilisieren. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch einen weiteren hochtourigen Zentrifugationsschritt abgetrennt. Das Detergenslysate wurde anschließend mit den Affinitäts-Matrices inkubiert, um das FLAG- bzw. das His-Epitop spezifisch zu binden.

In Abb. 25 rechts sind Prozesskontrollen mittels Immunodetektionen mit α FLAG (M2)-AK zu sehen. In Teil (A) sind die korrespondierenden Proben zum Prozessschema aus zwei Aufreinigungsexperimenten aus dem C-terminal epitopmarkierten Expressionssystem mit Ölsäureinduktion zu sehen, und Teil (B) zeigt korrespondierende Proben aus dem Expressionssystem mit galaktoseinduzierbarem Promotor und N-terminaler Epitopmarkierung. Da die Epitopmarkierung in beiden Expressionssystemen umgekehrt ist, wurde in Teil (A) Pxa2 und in Teil (B) Pxa1 mittels α FLAG (M2)-AK detektiert. Für beide Expressionssysteme ist jeweils ein Experiment abgebildet, bei dem für 2 h bzw. über Nacht mit DDM solubilisiert wurde.

Für die Prozesskontrollen wurden jeweils äquivalente Probenvolumina eingesetzt, um die Anreicherung von Pxa1p und Pxa2p verfolgen zu können. Die Immunodetektion zeigt, dass Pxa1p und Pxa2p ausschließlich Membrangebunden vorlagen, im Überstand S2, in dem sich die löslichen Proteine befanden, ist nahezu kein Signal des α FLAG (M2)-AK sichtbar. Weiterhin macht der Vergleich der Banden P3 und S3 deutlich, dass große Anteile von Pxa1p und Pxa2p nicht DDM solubilisierbar waren und dass dies unabhängig von der Solubilisierungsdauer war. Bei der Inkubation mit DDM über Nacht konnte der lösliche Anteil nicht gesteigert werden. In Experimenten, bei denen der unlösliche Rückstand P3 erneut mit DDM inkubiert wurde (auch bei RT), konnten jeweils noch einmal geringe Mengen solubilisiert werden, jedoch nie Mengen wie in der Größenordnung der ersten Solubilisierung (Daten nicht gezeigt).

Die Inkubation der solubilisierten Membranproteine (DDM Lysat) mit Ni-NTA Agarose zur Bindung des His-Epitops hat bei beiden Expressionssystemen nicht zu einer spezifischen Anreicherung von Pxa1p-(His)₆ bzw. (His)₁₀-Pxa2p geführt (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte durch Inkubation des DDM-Lysats mit ANTI-FLAG (M2)-Affinity Gel eine spezifische Anreicherung erzielt werden, wie in Abb. 26 zu sehen ist. Das DDM-Lysat wurde mit dem ANTI-FLAG (M2)-Affinity Gel inkubiert, das Gel wurde gewaschen und das gebundene Protein wurde durch Elution mit 3xFLAG Peptid von der Matrix verdrängt. Die Abb. 26 zeigt eine SDS-PAGE der ersten vier Elutionsfraktionen von Aufreinigungen aus beiden Expressionssystemen.

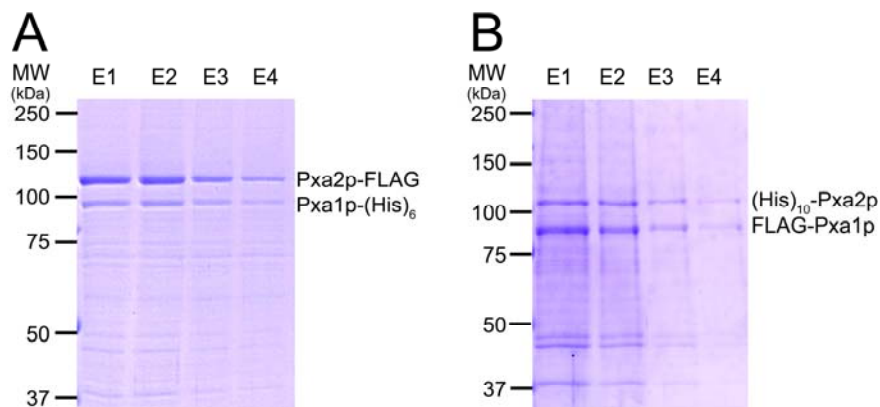


Abb. 26: Analyse der Affinitätsaufreinigung von Pxa1p und Pxa2p mit ANTI-FLAG (M2)-Affinity Gel mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung. (A) zeigt die Elutionsfraktionen E1 – 4 einer Aufreinigung aus dem vektorkodierten Expressionssystem mit ölsäureinduzierbarem Promotor und C-terminaler Epitopmarkierung von Pxa2p mit FLAG Epitop und (B) zeigt Elutionsfraktionen des genomisch markierten Stammes mit galaktoseinduzierbarem Promotor und N-terminaler Markierung von Pxa1p mit dem FLAG Epitop. Die beiden dominanten Banden bei ~100 kDa repräsentieren jeweils wie in der Abbildung beschrieben die epitopmarkierten Mutanten von Pxa2p und Pxa1p.

Bei den Affinitätsaufreinigungen an ANTI-FLAG (M2)-Affinity Gel konnten, wie die Coomassie-Blau gefärbte SDS-PAGE in Abb. 26 zeigt, nicht nur ein dominantes Protein aufgereinigt werden, sondern es fanden sich zwei etwa gleich starke Banden in der Umgebung des 100 kDa Markers. Das Molekulargewicht dieser Banden entspricht relativ genau der theoretischen Größe von Pxa1p mit 100 kDa und Pxa2p mit 97,1 kDa. Zur Verifizierung der Zuordnung wurden an der Ruhr-Universität Bochum die beiden Banden aus einer Aufreinigung des C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p mittels ESI-MS sequenziert, dies ergab die Bestätigung der beiden Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p. Das Dimer des ABC-Transporters Pxa1p-Pxa2 ließ sich somit mittels einstufiger Aufreinigung als Komplex in relativ hoher Reinheit aus beiden Expressionssystemen isolieren. Die Bande im Gel, mit einem Molekulargewicht >100 kDa, ist jedoch nicht das größere Pxa1p, sondern der kleinere Dimerisierungspartner Pxa2p. Die densitometrische Quantifizierung verschiedener Aufreinigungsexperimenten ergab eine Reinheit von Pxa1p-Pxa2p von 65 – 85%.

Die Pxa1p- und Pxa2p Bande in der Abbildung ist jeweils beschriftet. Auffällig ist, dass der Halbtransporter mit FLAG-Epitop, der zwischen den beiden Expressionssystemen vertauscht ist, in beiden Experimenten eine etwas höhere Konzentration aufweist, als der Dimerisierungspartner. So ist Abb. 26 Teil (A) Pxa2p-FLAG leicht stärker konzentriert, während in Teil (B) FLAG-Pxa1p dominierend ist.

Die Gesamtproteinkonzentration in den Elutionsfraktionen schwankte sehr stark zwischen den einzelnen Experimenten. Beim Expressionssystem mit galaktoseinduzierbarem Promotor betrug die mittlere Ausbeute ca. 30 - 35 µg/g Zellfeuchtgewicht. Beim Expressionssystem mit ölsäureinduzierbarem Promotor war die Ausbeute geringer, hier betrug sie ca. 15 - 20 µg/g Feuchtgewicht.

Die Elutionsfraktionen des aufgereinigten ABC-Transporters Pxa1p-Pxa2p wurden direkt weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -75 °C gelagert. Das Schockgefrieren führte zu keiner Beeinträchtigung der ATPase Aktivität, während eine Aufkonzentrierung der Elutionsfraktionen mit Centrikon 100 Zentrifugationskonzentratoren bereits bei einer Konzentrierung um den Faktor zwei zur völligen Inaktivierung der ATPase Aktivität führte. Diese Inaktivierung war bereits in Konzentrationsbereichen zu verzeichnen, in denen das Protein noch gelöst vorlag. Bei einer weiteren Konzentrierung waren auch makroskopisch Aggregate erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Pxa1p-Pxa2p Solubilisierungen und Aufreinigungen wurden generell in Anwesenheit von 20% Glycerin durchgeführt, da Glycerin laut Literaturangaben vor osmotischen Schwankungen schützt und dimere ABC-Transporter stabilisiert [59]. Für wenige spezielle Anwendungen ist Glycerin jedoch störend, z.B. bei der Dünnschichtchromatographie, weshalb eine Pxa1p-Pxa2p Aufreinigung unter Verzicht auf Glycerin durchgeführt wurde. Die SDS-PAGE und der Immunologische Nachweis von Pxa1p in den Elutionsfraktionen dieses Experiments sind in Abb. 27 abgebildet.

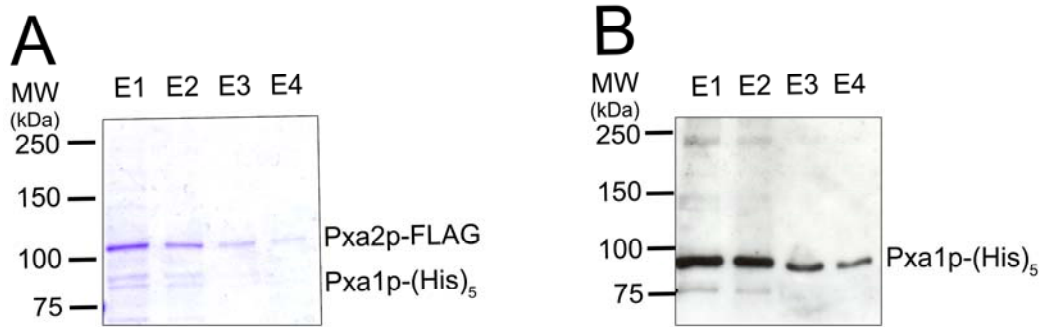


Abb. 27: Analyse der Affinitätsaufreinigung von Pxa1p-Pxa2p unter Verzicht von Glycerin in den Elutionsfraktionen. Aufreinigung aus dem vektorkodierten Expressionssystem mit ölsäureinduzierbarem Promotor und C-terminaler Epitopmarkierung mit ANTI-FLAG (M2)-Affinity Gel. (A) Coomassie-Blau Färbung einer SDS-PAGE der Elutionsfraktionen E1 – 4 und (B) Immunodetektion derselben Proben mit α Pxa1p-Antiserum.

Im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel in Abb. 27 Teil (A) der Elutionsfraktionen einer Pxa1p-Pxa2p Aufreinigung ohne Glycerin sind für Pxa1p-(His)₆ zwei etwa gleich starke Banden erkennbar. Von diesen Banden wurde nur die größere Bande vom α Pxa1p-Antiserum in Teil (B) erkannt. Diese Fragmentierung von Pxa1p wurde bei der Aufreinigung von Pxa1p-Pxa2p unter Anwesenheit von Glycerin nicht beobachtet (siehe Abb. 26). Außerdem zeigten die Elutionsfraktionen zunächst eine hohe ATPase Aktivität, die nach dem Schockgefrieren und Auftauen der Proben jedoch nicht mehr vorhanden war, stattdessen waren in der Probe Aggregate zu sehen. Glycerin hat demnach tatsächlich einen stabilisierenden Einfluss auf Pxa1p und Pxa2p und es scheint die Aggregation zu verhindern.

4.2.4 Substratstabilität bei Inkubation mit aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p

Bei der Inkubation von ^{14}C -Lauroyl-CoA und ^{14}C -Oleoyl-CoA mit peroxisomalen Membranproteinen in 4.1.1 trat massiver Substratabbau auf. Zur Überprüfung des Einflusses der aufgereinigten ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p oder von Kontaminationen in den Elutionsfraktionen auf das Substrat wurde ^{14}C -Oleoyl-CoA mit aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Substrat in proteinfreiem Puffer und mit Hefetotalysat inkubiert. Die Proben wurden mittels Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie wie unter 3.6.2 beschrieben analysiert und densitometrisch quantifiziert.

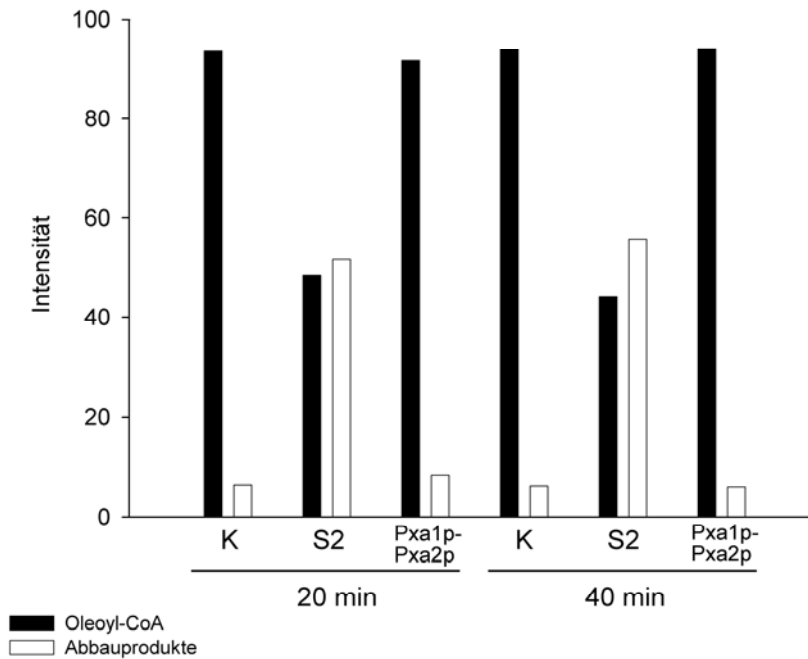


Abb. 28: Substratstabilitätsuntersuchung von ^{14}C -Oleoyl-CoA nach Inkubation mit aufgereinigtem C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p im Vergleich mit einer proteinfreien Kontrolle (K) und bei Inkubation mit Hefetotallysat (S2 siehe Abb. 25). Je 250 nCi ^{14}C -Oleoyl-CoA wurde im 200 μl Ansatz mit Puffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM KCl pH 7,4) und 100 μl Hefetotallysat bzw. 100 μl Pxa1p-Pxa2p (Proteinkonzentration $\sim 96 \mu\text{g/ml}$) aus einer Affinitätsaufreinigung ohne Glycerin versetzt und bei 18 °C inkubiert. Nach 20 und 40 min wurden 100 μl Proben entnommen und zum Stoppen der Reaktion auf Eis mit 200 μl Chloroform/ Methanol (2,2:1) versetzt. Gefällte Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Gesamtüberstand wurde auf eine Silikagel 60 TLC Platte (Merck) aufgetragen und in Butanol/Eisessig/Wasser (80:30:30) entwickelt [89]. Das ^{14}C -Signal wurde durch Bestrahlung eines Phosphorscreens (FujiFilm) und Detektion mit dem Phosphorimager analysiert. Die densitometrische Signalquantifizierung wurde mit dem Computerprogramm AIDA durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Signalintensitäten von Oleoyl-CoA (schwarz) bzw. der Abbauprodukte (weiß) der Proben nach Inkubation für 20 und 40 min.

Die Stabilitätsuntersuchung von ^{14}C -Oleoyl-CoA in Abb. 28 zeigt, dass Pxa1p-Pxa2p und die gering konzentrierten Kontaminationen in den Elutionsproben der Aufreinigung innerhalb von 40 min keine Veränderung des Substrates verursachten. Das Substrat verhielt sich wie bei der proteinfreien Kontrolle, während es bei Inkubation mit Hefetotallysat nach 40 min zu mehr als 50% abgebaut war.

4.2.5 Native Gelelektrophorese und ATPase Aktivität

Als Nachweismethode der ATPase Aktivität, bei der sich die ATP Hydrolyse direkt einer bestimmten Proteinspezies zuordnen lässt, wurde der ATPase Aktivitätsnachweis im nativen Gel versucht. Aufgereinigtes C-terminal epitopmarkiertes Pxa1p-Pxa2p wurde für eine „clear native“ Gelelektrophorese eingesetzt [73], ein Gel wurde anschließend für einen ATPase Assay verwendet [60] und ein weiteres mittels Silberfärbung visualisiert. Als Kontrolle wurden parallel DDM solubilisierter Hefemembranproteine aufgetragen. Der ATPase Assay beruht darauf, dass das Gel in einer Pufferlösung mit ATP und Bleiacetat inkubiert wird, bei Proteinen mit ATPase Aktivität führt das bei der ATP Hydrolyse frei werdende P_i zu einer Reaktion mit Bleiacetat und es entsteht ein unlöslicher weißer Niederschlag auf Höhe der Proteinbande.

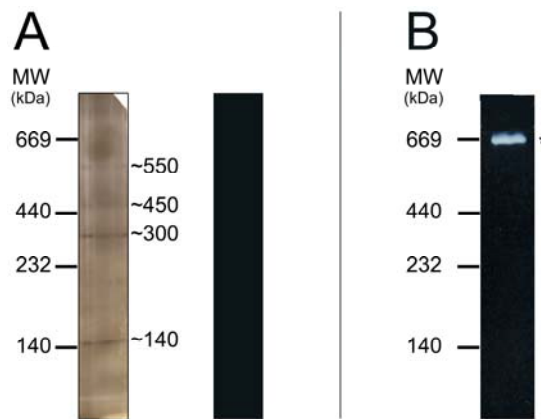


Abb. 29: Native Gelelektrophorese und ATPase Aktivität. (A) Natives Gradientengel (6 – 13%) mit aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p und Silberfärbung, der ATPase Aktivitätstest rechts hat kein Signal ergeben (B) Kontrolle des ATPase Aktivitätstests im nativen Gel mit DDM solubilisierten *S. cerevisiae* Membranproteinen, das farblose Gel wurde vor einem schwarzen Hintergrund digitalisiert.

Im nativen Gel bleiben Proteinkomplexe erhalten und Dimerisierungsgrade sowie Proteinsuperkomplexe lassen sich analysieren. Beim aufgereinigten C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p in Abb. 29 Teil (A) sind vier Banden mit ~140, ~300, ~450 und ~550 kDa erkennbar. Die 140 kDa Bande könnte dem Monomer entsprechen (Pxa1p = 100 kDa; Pxa2p = 97,1 kDa), da die Migration im nativen Gel nicht exakt entsprechend dem Molekulargewicht verläuft. Die intensivste 300 kDa Bande wäre dann das Pxa1p-Pxa2p Dimer. Die 550 kDa Bande könnte das Tetramer repräsentieren und die 450 kDa Bande ein nicht sehr wahrscheinliches Trimer. Die Immunodetektion mit α FLAG (M2)-AK hatte kein Signal ergeben (der Transfer aus dem Gel auf die Membran würde durch Silberfärbung überprüft). Auch die ATPase Aktivität des aufgereinigten Pxa1p-Pxa2p im nativen Gel blieb negativ, Abb. 29 Teil (B) zeigt die Positivkontrolle, hier wurden DDM solubilierte Hefemembranproteine (DDM Lysat) aufgetragen. Die weiße Bande repräsentiert vermutlich den mitochondrialen F_1F_o -ATP Synthase Atmungskettenkomplex mit einer monomeren Größe von ~600 kDa [60].

Die dominanten Banden im nativen Gel repräsentieren wahrscheinlich Pxa1p und Pxa2p Monomere, die sich im nativen Gel aufgrund des sehr ähnlichen Molekulargewichtes nicht voneinander trennen ließen (~150 kDa) und mit der doppelten Größe das Pxa1p-Pxa2p Dimer (~300 kDa). Damit wäre gezeigt, dass Pxa1p-Pxa2p wahrscheinlich als Dimer und nicht in einer höheren Komplexität auftritt. Leider hat die Immunodetektion kein Signal ergeben, so dass der endgültige Beweis nicht geführt werden konnte.

Die ATPase Aktivität im nativen Gel wurde bisher nur für sehr wenige Proteine wie die mitochondriale F_1F_o -ATP Synthase und TF_1 aus einem thermophilen Bakterium beschrieben [60, 96]. Das Ausbleiben des weißen Niederschlags im Gel besagt deshalb nicht, dass das Protein keine ATPase Aktivität besitzt.

4.2.6 Nukleotid Bindung

Zur Charakterisierung der ATP Bindung von Pxa1p-Pxa2p und zur Identifizierung möglicher kontaminierender ATPasen wurden UV-Licht induzierte Markierungsexperimente mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP wie unter 3.6.7 beschrieben durchgeführt. Das radioaktiv markierte ATP Analogon setzt sich in die Nukleotidbindungstasche und kann durch UV-Licht induzierte Photoelimination eines Stickstoffmoleküls aus der Azidogruppe und nachfolgender Reaktion des gebildeten Nitrens mit einer benachbarten OH-Gruppe des Proteins kovalent gebunden werden.

Die Ergebnisse der 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Markierungsexperimente sind in Abb. 30 und Abb. 31 zu sehen. Abbildung Abb. 30 Teil (A) und (B) zeigen eine komplette Spur im SDS-Gel mit aufgereinigtem DDM solubilisiertem N-terminal bzw. C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p nach Inkubation mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP und MgCl_2 bei 27 °C. In den Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gelen sind neben den dominanten Banden für Pxa2p und Pxa1p schwächere kontaminierende Banden erkennbar. Die Coomassie-Blau gefärbten Banden von Pxa2p und Pxa1p korrespondieren exakt mit den ^{32}P Autoradiographiebanden. Die Bindung von Pxa2p und Pxa1p beträgt für das N-terminal epitopmarkierte Konstrukt 23,7% bzw. 20,5%. Das Pxa1p-Pxa2p Dimer ist mit einer Gesamtbindingkapazität von 44% des ATP Analogons, das dominierende nukleotidbindende Protein in der Aufreinigung. Daneben finden sich in der Autoradiographie kontaminierende nukleotidbindende Proteine mit ~70 kDa (15,4% Bindung), ~50 kDa (17,4% Bindung) und ~40 kDa (8,7% Bindung). Von diesen 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP bindenden Kontaminationen, korrespondieren nicht alle Autoradiographiebanden mit einer Bande im Coomassie-Blau gefärbten Gel, d.h. es handelt sich dabei teilweise um gering konzentrierte Proteine mit einer hohen Nukleotidbindungsaffinität. Beim N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p verfügt Pxa1p über das FLAG-Epitop und findet sich deshalb in den isolierten Proteinproben geringfügig stärker konzentriert, wie in der Coomassie-Blau Färbung erkennbar ist. Dennoch ist die ^{32}P Autoradiographiebande von Pxa2p stärker. Die 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung des isolierten C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p in Abb. 30 Teil (B) zeigt in ähnlicher Weise, dass Pxa1p und Pxa2p mit 46,1% bzw. 22,3% die dominierenden Nukleotidbindenden Proteine in der Probe darstellen. Beim C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p hängt das FLAG-Epitop am Pxa2p Halbtransporter, weshalb dieser geringfügig stärker konzentriert ist. Die bereits beim N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p vorhandene Asymmetrie der Nukleotidbindung wird hier deshalb noch stärker deutlich. In der Probe sind dieselben kontaminierenden nukleotidbindenden Proteine zu finden, wie in Teil (A), obwohl die Kultivierungsbedingungen unterschiedlich waren. Die Bindung der Kontaminationen mit ~70 kDa (11,9% Bindung), ~50 kDa (13,2% Bindung) und ~40 kDa (6,5% Bindung) beträgt zusammen 31,6%, so dass der Anteil von Pxa1p-Pxa2p an der Bindung 68,4% beträgt.

Besonders bemerkenswert ist die unsymmetrische 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung der beiden ABC-Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p. Das C-terminal epitopmarkierte Pxa2p hat mit einem Bindungsanteil von 46,1% eine 2-fach stärkere Bindung als Pxa1p mit einem Anteil von 22,3%. Etwas geringer ist der Unterschied bei den N-terminal epitopmarkierten Halbtransportern, dort hat Pxa2p mit 23,7% eine 1,2-fach stärkere Bindung als Pxa1p (20,5%), obwohl die Pxa2p Konzentration laut Coomassie-Blau Färbung niedriger ist als die Pxa1p Konzentration. Die unterschiedlichen Verhältnisse sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei der FLAG-Epitop Affinitätsaufreinigung des C-terminal markierten Proteins Pxa2p stärker angereichert ist als Pxa1p im Gegensatz zum N-

terminal epitopmarkierten Protein. Dort findet sich aufgrund der unterschiedlichen Anordnung der Epitope Pxa1p stärker angereichert.

Zur Überprüfung des Einflusses von MgCl_2 und Oleoyl-CoA auf die 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung, wurden die beiden C- und N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p Varianten +/- MgCl_2 und +/- Oleoyl-CoA bei 4 °C und bei 27 °C inkubiert. Abb. 30 Teil (C) zeigt das N-terminal epitopmarkierte Pxa1p-Pxa2p und Teil (D) zeigt das C-terminal epitopmarkierte Protein. Beide epitopmarkierte Varianten von Pxa1p-Pxa2p sind in der Lage 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP sowohl bei 4 °C als auch bei 27 °C mit und ohne MgCl_2 zu binden. Die Bindung bei 27 °C ist dabei geringfügig reduziert, dies kann jedoch nicht mit einer höheren Austauschrate verursacht durch die ATP Hydrolyse begründet werden, da dieser Effekt ebenfalls ohne Zugabe von MgCl_2 auftritt. Die Zugabe des potenziellen Transportsubstrates Oleoyl-CoA hatte keinen stimulierenden Einfluss auf die 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung.

Während das N-terminal epitopmarkierte Pxa1p-Pxa2p in Abb. 30 Teil (C) in Abwesenheit von MgCl_2 leicht schwächer bindet, zeigt das C-terminal epitopmarkierte Pxa1p-Pxa2p in Teil (D) hier eine etwas stärkere Bindung. Eine leicht verstärkte Nukleotidbindung in Abwesenheit von MgCl_2 wurde auch für die humanen peroxisomalen ABC-Transportern ABCD1 und ABCD3 beschrieben [84].

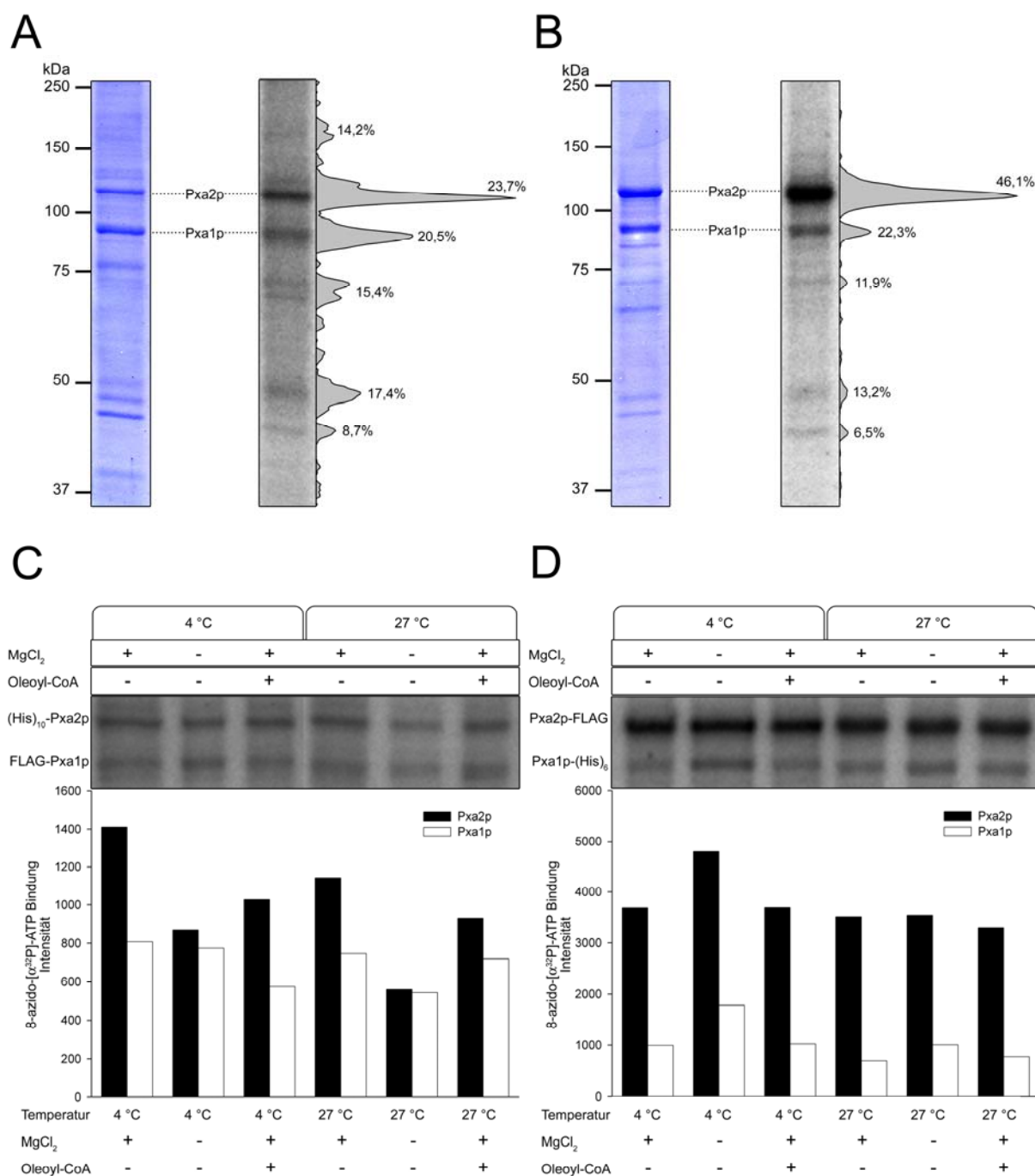


Abb. 30: UV-Licht induzierte 8-azido-[α³²P]-ATP Bindungsexperimente. (A) Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel und ³²P Autoradiografie von 0,8 μM (160 μg/ml) aufgereinigtem N-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p mit kontaminierenden Proteinen nach Inkubation mit 5 μM 8-azido-[α³²P]-ATP und MgCl₂ bei 27 °C. Neben der Autoradiografie ist die densitometrische Signalquantifizierung von ³²P sichtbar. Die 8-azido-[α³²P]-ATP Bindung von Pxa1p und Pxa2p beträgt 23,7% bzw. 20,5%. (B) wie bei (A) mit 1 μM (210 μg/ml) aufgereinigtem C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p. Die 8-azido-[α³²P]-ATP Bindung von Pxa1p und Pxa2p beträgt 46,1% bzw. 22,3%. (C) 0,8 μM N-terminal epitopmarkiertes Pxa1p-Pxa2p wurde mit 5 μM 8-azido-[α³²P]-ATP, +/- MgCl₂ und +/- Oleoyl-CoA bei 4 °C und 27 °C inkubiert. Nach der UV-Licht induzierten kovalenten Verknüpfung von 8-azido-[α³²P]-ATP mit den Proteinen wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Unter den Autoradiographiebanden von Pxa1p und Pxa2p sind die densitometrisch quantifizierten Signalintensitäten aufgetragen. (D) wie bei (C) mit 1 μM C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p.

Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten für ATP $K_{D(ATP)}$ wurden Bindungsexperimente mit steigenden Konzentrationen 8-azido- $[\alpha^{32}P]$ -ATP und Konkurrenzexperimente von 8-azido- $[\alpha^{32}P]$ -ATP mit steigenden Konzentrationen von unmarkiertem ATP wie unter 3.6.7 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 31 gezeigt.

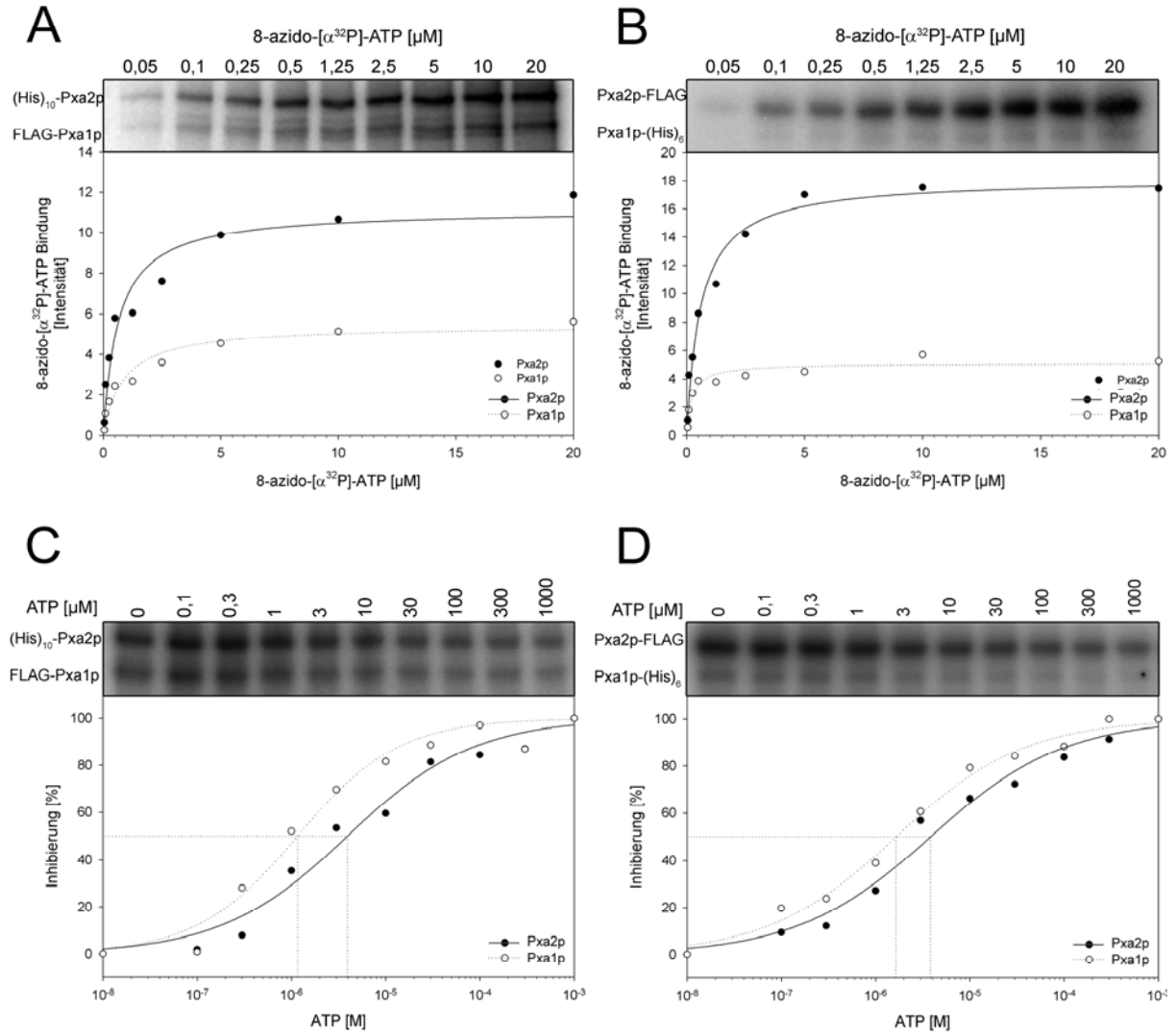


Abb. 31: UV-Licht induzierte 8-azido- $[\alpha^{32}P]$ -ATP Bindungs- und ATP Konkurrenzexperimente. (A) Bindungsexperiment mit 0,8 μ M (160 μ g/ml) aufgereinigtem N-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen 8-azido- $[\alpha^{32}P]$ -ATP (siehe Abbildung) und 5 mM $MgCl_2$. Die Intensitäten wurden gegen die Konzentrationen aufgetragen und die Dissoziationskonstanten $K_{D(8\text{-azido-ATP})}$ wurden mit einer nichtlinearen Regressionsanalyse, unter Verwendung der Langmuir'schen Sättigungsisotherme bestimmt. Sie beträgt 0,6 μ M für Pxa2p und 0,8 μ M für Pxa1p. (B) wie bei (A) mit 1 μ M (210 μ g/ml) aufgereinigtem C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p. Die Dissoziationskonstanten betragen 0,6 μ M für Pxa2p und 0,2 μ M für Pxa1p. (C) ATP Konkurrenzexperiment von 0,8 μ M aufgereinigtem N-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p mit 5 μ M 8-azido- $[\alpha^{32}P]$ -ATP mit unterschiedlichen ATP Konzentrationen (siehe Abbildung). Unter den Autoradiografiebanden von Pxa2p und Pxa1p sind die densitometrischen Intensitäten nach Hintergrundbereinigung und Normierung im Diagramm gegen die logarithmische ATP Konzentration aufgetragen. Die IC_{50} Konzentration an unmarkiertem ATP bei halbmaximaler Besetzung der Bindungstaschen durch 5 μ M 8-azido- $[\alpha^{32}P]$ -ATP wurde zweimal wie unter 3.6.7 beschrieben bestimmt und beträgt $3,0 \pm 0,9 \mu$ M für Pxa2p mit einem Hill-Koeffizienten von $0,8 \pm 0,1$ und $1,7 \pm 0,6 \mu$ M für Pxa1p mit einem Hill-Koeffizienten von $0,9 \pm 0,1$. (D) wie bei (C) mit 1 μ M aufgereinigtem C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p. Die halbmaximale Inhibitorkonzentration IC_{50} beträgt $2,7 \pm 1,2 \mu$ M für Pxa2p, mit einem Hill-Koeffizienten von $0,9 \pm 0,3$ und $1,8 \pm 0,1 \mu$ M für Pxa1p, mit einem Hill-Koeffizienten von $0,8 \pm 0,2$.

Der Bindungstest mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP in Abb. 31 Teil (A) und (B), wurde durchgeführt, um die Dissoziationskonstanten $K_{D(8\text{-azido-ATP})}$ abzuschätzen. Aufgereinigtes Pxa1p-Pxa2p wurde mit steigenden Konzentrationen 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP inkubiert und verknüpft. Die Intensitäten wurden gegen die 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Konzentrationen aufgetragen und die Dissoziationskonstante wurde durch eine nichtlineare Regressionsanalyse unter Verwendung der Langmuir'schen Sättigungsisotherme abgeschätzt. Die Dissoziationskonstanten $K_{D(8\text{-azido-ATP})}$ sind in Tab. 1 aufgelistet.

Tab. 1: Dissoziationskonstante $K_{D(8\text{-azido-ATP})}$:

	Pxa2p	Pxa1p
	$K_{D(8\text{-azido-ATP})}$ [μM]	$K_{D(8\text{-azido-ATP})}$ [μM]
N-terminal epitopmarkiert	0,6	0,8
C-terminal epitopmarkiert	0,6	0,2

Die Konkurrenzexperimente von 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP und steigenden Konzentrationen von kaltem ATP wurden in Doppelbestimmung durchgeführt. In Abb. 31 Teil (C) und (D), ist eines der Experimente dargestellt. Abb. 31 Teil (C) zeigt das N-terminal und Teil (D) das C-terminal epitopmarkierte Pxa1p-Pxa2p. Die Inhibierung der 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung wurde gegen die logarithmische ATP Konzentration aufgetragen und die Datenpunkte wurden mit einer Hill-Funktion angepasst, um die halbmaximale Inhibitorkonzentration und die Hill-Koeffizienten zu ermitteln. Die Mittelwerte der Doppelbestimmung sind in Tab. 2 aufgelistet. Die Werte für den N- und den C-terminal epitopmarkierten ABC-Transporter liegen sehr nahe beieinander und geben Hinweise darauf, dass sich die unterschiedlich epitopmarkierten Halbtransporter im Konkurrenzexperiment ähnlich Verhalten. Die Hill-Koeffizienten (Hill-K.) in Tab. 2 liegen nahe bei 1, wodurch keine Kooperativität angezeigt wird.

Tab. 2: Halbmaximale Inhibitorkonzentrationen IC_{50} und Hill-Koeffizienten:

	Pxa2p		Pxa1p	
	IC_{50} [μM]	Hill-K.	IC_{50} [μM]	Hill-K.
N-terminal epitopmarkiert	3,0 \pm 0,9	0,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,6	0,9 \pm 0,1
C-terminal epitopmarkiert	2,7 \pm 1,2	0,9 \pm 0,3	1,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2

Aus den Dissoziationskonstanten $K_{D(\text{azido-ATP})}$ und den halbmaximalen Inhibitorkonzentrationen IC_{50} wurden, mittels der Cheng-Prusoff Gleichung (siehe 3.6.7), die Dissoziationskonstanten $K_{D(\text{ATP})}$ für ATP abgeschätzt (Tab. 3). Die Dissoziationskonstanten $K_{D(\text{ATP})}$ sind sowohl für beide Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p, als auch für die beiden C- und N-terminal epitopmarkierten Varianten sehr ähnlich. Eine Abweichung stellt Pxa1p C-terminal epitopmarkiert mit einer Dissoziationskonstante $K_{D(\text{ATP})}$ von 0,07 μM dar. Dieser deutlich niedrigere Wert resultiert aus $K_{D(8\text{-azido-ATP})} = 0,2 \mu\text{M}$ und ist wahrscheinlich ein Messfehler, der auf der leicht unsymmetrischen Aufreinigung, der beiden Halbtransporter beruht. Beim C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p hängt das FLAG-

Epitop an Pxa2p, weshalb Pxa1p etwas geringer konzentriert war. Die ohnehin geringere Bindung von Pxa1p erfuhr dadurch eine weitere Signalabschwächung, wodurch die Auswertung erschwert wurde. Die geringen Intensitätsunterschiede führten zu einer sehr frühen Sättigung und einem sehr steilen Kurvenanstieg (siehe Abb. 31 Teil (B)). Die Dissoziationskonstanten $K_{D(ATP)}$ weisen mit Werten zwischen 0,24 und 0,32 μM , bei Vernachlässigung der Abweichung von 0,07 μM , auf sehr hohe ATP Bindungsaffinitäten für Pxa1p und Pxa2p hin. Die Affinitäten beider Transporter sind trotz der unsymmetrischen Bindung sehr ähnlich, die Schwankungen bewegen sich innerhalb des Messfehlers. Die Bindungsexperimente weisen auf eine gegenseitige Beeinflussung der nukleotidbindenden Domänen von Pxa1p und Pxa2p hin. Da beide Halbtransporter annähernd gleich konzentriert sind, sollten bei vollständiger Sättigung beide Transporter ähnliche Konzentrationen 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP gebunden haben. Da dies nicht der Fall ist, und Pxa1p trotz der geringeren Bindung eine ähnliche Dissoziationskonstante aufweist, muss eine gegenseitige Beeinflussung von Pxa1p und Pxa2p stattfinden.

Tab. 3: Dissoziationskonstanten $K_{D(ATP)}$:

	Pxa2p	Pxa1p
N-terminal epitopmarkiert	0,32 \pm 0,10 μM	0,24 \pm 0,09 μM
C-terminal epitopmarkiert	0,29 \pm 0,12 μM	(0,07 \pm 0,01 μM)

Bei den Dissoziationskonstanten in Tab. 3 handelt es sich nur um Näherungswerte, die aus den Einzel- bzw. Doppelbestimmungen resultieren, überdies wird die Cheng-Prusoff Gleichung generell als weniger exakt betrachtet, als traditionelle Messungen mit variierenden Substratkonzentrationen [15].

Neben den Bindungsexperimenten wurden Trappingexperimente mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP und verschiedenen ATPase Inhibitoren durchgeführt. Metallfluoride wie Berylliumfluorid (BeF_x) und Aluminiumfluorid (AlF_x) sowie Na-Orthovanadat (V_i), können als Analogon des γ -Phosphats von ATP wirken. Sie bilden einen Komplex mit Mg^{2+} und ADP und ahmen den Übergangszustand bei der ATP Hydrolyse nach, den sie durch das Trapping fixieren. Das Ergebnis eines solchen Experimentes ist in Abb. 32 dargestellt. Teil (A) zeigt das N-terminal und Teil (B) das C-terminal epitopmarkierte Pxa1-Pxa2p. Für beide epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p Varianten wurde kein Na-Orthovanadat-abhängiges Trapping beobachtet. Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen an humanen peroxisomalen ABC-Transportern [53]. Bei dem C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p, konnte durch Inkubation mit den Metallfluoriden BeF_x und AlF_x Trapping gezeigt werden, für das N-terminal epitopmarkierte Pxa1p-Pxa2p war nur bei Zugabe von AlF_x Trapping zu sehen. Die Unterschiede im Trappingverhalten für Berylliumfluorid können nicht erklärt werden, und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Das Nukleotid konnte bei beiden epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p Varianten in beiden Halbtransportern getrappt werden, wobei das relative Trapping, im Vergleich zur Hintergrundintensität, für Pxa1p stärker war.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Transporterkomplex für das N- und das C-terminal epitopmarkierte Pxa1p-Pxa2p eine ATPase Aktivität besitzt, da die Phosphatanaloga das freigesetzte Phosphatation direkt nach der ATP Hydrolyse ersetzen und dabei einen stabilen $\text{Mg}\cdot\text{ADP}\cdot\text{Inhibitor}$ Komplex in der NBD bilden können. Das Trapping der Nukleotide in beiden Halbtransportern gibt Hinweise darauf, dass beide Halbtransporter an der ATP Hydrolyse beteiligt sind. Allerdings könnte das Nukleotidtrapping auch durch einen anderen Mechanismen erfolgen: ADP, das als Produkt der ATP Hydrolyse kontaminierender ATPasen in

den Reaktionsansätzen vorliegt, bindet in der NBD von Pxa1p und Pxa2p. Der ADP Bindung folgt die Bindung eines Inhibitors wodurch der Komplex stabilisiert und fixiert wird. Nur beim ersten Mechanismus kann aufgrund des Trappings auf eine ATPase Aktivität geschlossen werden. Die Ergebnisse für andere ABC-Transporter zeigen, dass z.B. für P-gp das ATP-Trapping sich nicht vom ADP-Trapping unterscheidet [70], während Tap1/Tap2 nur Nukleotidtrapping bei Hydrolyse von ATP zeigt [14]. Zur Abgrenzung beider möglicher Mechanismen, könnten Trappingexperimente sowohl mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP als auch mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ADP durchgeführt werden. Da es sich bei den Proteinproben jedoch um isolierte ABC-Transporter handelt, die nur noch Spuren kontaminierender Proteine enthalten, wurde auf die Trappingkontrolle mit ADP verzichtet.

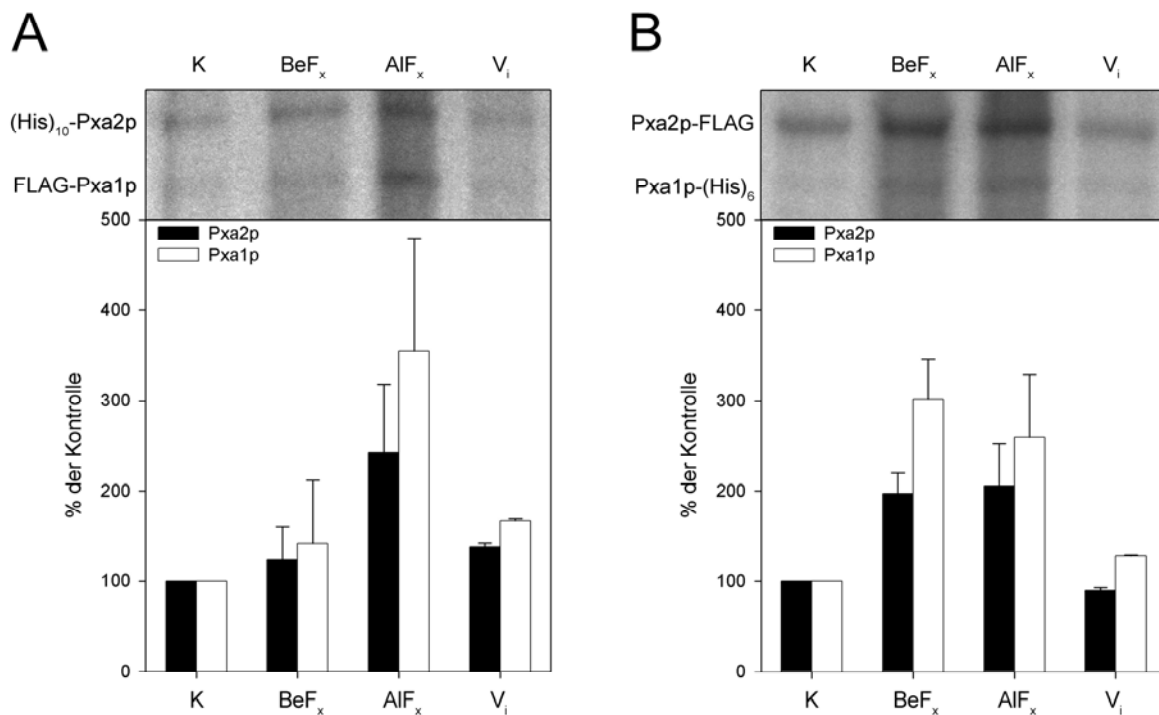


Abb. 32: Analyse verschiedener ATPase Inhibitoren in Trappingexperimenten mit isoliertem Pxa1p-Pxa2p. (A) 0,8 μM N-terminal epitopmarkiertes Pxa1p-Pxa2p wurde mit 5 mM MgCl_2 , 5 μM 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP und verschiedenen Inhibitoren (Berylliumfluorid (BeF_x), Aluminiumfluorid (AlF_x) und Na-Orthovanadat (V_i); je 1 mM) für 20 min im Dunkeln bei 27 °C inkubiert. Zum Verdrängen des nicht getrappten 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP wurde unmarkiertes ATP im 2500-fachen molaren Überschuss zugegeben und erneut für 10 min bei 27 °C inkubiert, bevor die Proben für 5 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt wurden. Nach der UV-Licht induzierten kovalenten Verknüpfung von 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP mit den Proteinen, wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Unter den Autoradiographiebanden von Pxa1p und Pxa2p sind die densitometrisch quantifizierten Signalintensitäten, relativ zur Kontrolle K ohne Inhibitor aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Proben eines Experimentes, die mit zwei SDS-Gelen aufgetrennt und zweimal quantifiziert wurden. (B) wie bei (A) mit 1 μM C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p.

4.2.7 ATPase Aktivität von aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p

ABC-Transporter sind unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie auch ohne Substrattransport eine niedrige basale ATP Hydrolyse aufweisen, die durch Zugabe von Transportsubstraten steigerbar ist [44, 55]. Bei den angereicherten peroxisomalen WT-Membranen (siehe 4.1) konnte, wahrscheinlich aufgrund des niedrigen Expressionslevels von Pxa1p-Pxa2p, keine ATPase Aktivität gemessen werden. Bei der Affinitätsaufreinigung werden die ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p deutlich höher konzentriert und eine nachweisbare ATPase Aktivität wäre ein

starker Hinweis für den Erhalt der Aktivität während der Aufreinigung. Der Erhalt der Aktivität ist unter anderem von der Wahl des Detergens, den Pufferbedingungen und Zusätzen wie Glycerin oder Saccharose abhängig, die nicht vorhergesagt werden können, sondern immer experimentell ermittelt werden müssen. Die ATPase Aktivitätsmessungen der detergenssolubilisierten und aufgereinigten ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p wurde mit dem EnzChek Phosphat Nachweis Kit von Invitrogen durchgeführt. Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und der Empfindlichkeit der EnzChek Messung, wurde eine radioaktive Messung mit der gleichen Proteinprobe parallel durchgeführt. Ein Vergleich beider Messmethoden ist in Abb. 33 gezeigt.

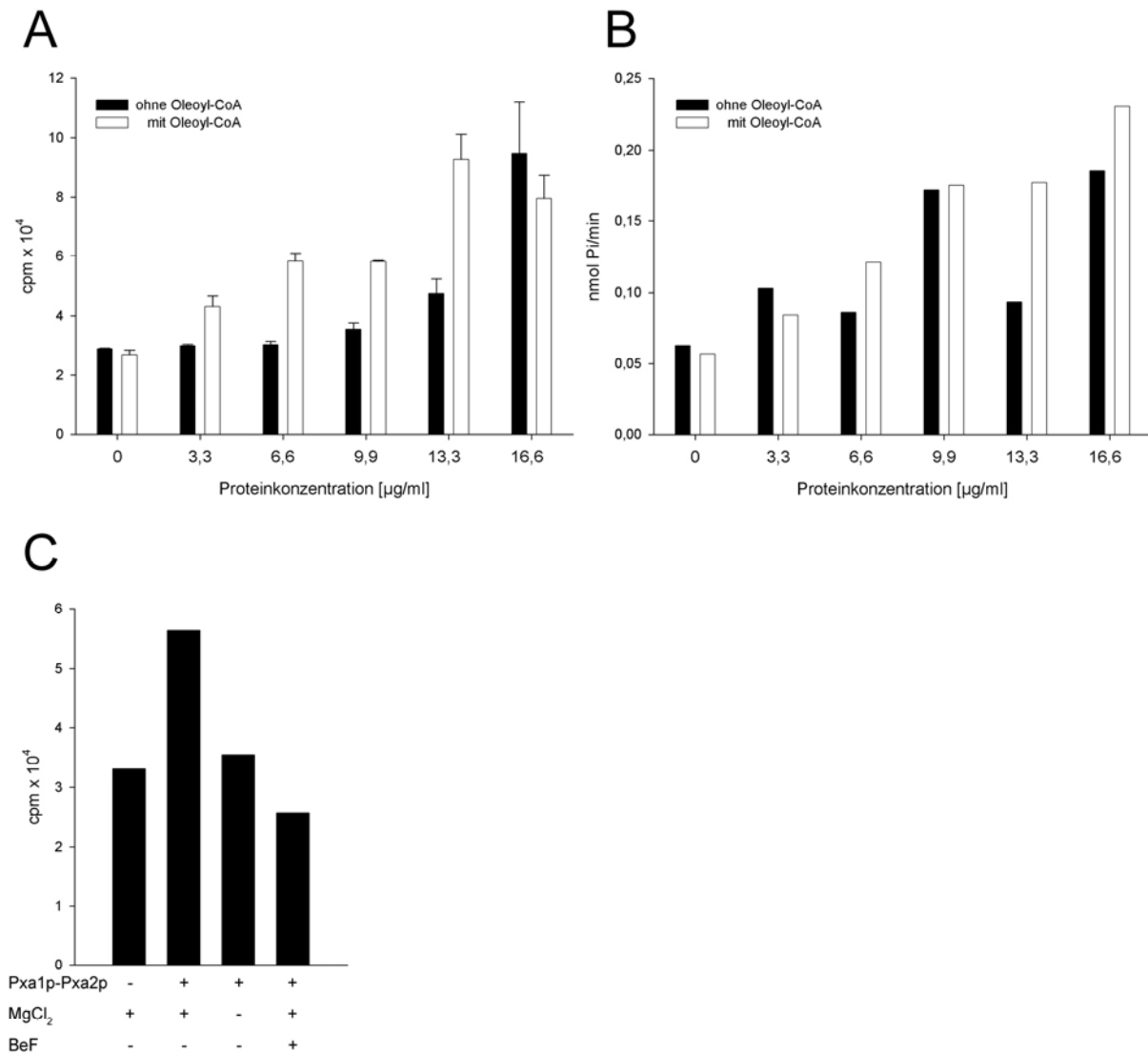


Abb. 33: Vergleich zwischen der radioaktiven ATPase Messung mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und der kolorimetrischen EnzChek ATPase Messung, zur Überprüfung der Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit der nicht-radioaktiven Messmethode. Für beide Messmethoden wurden steigende Konzentrationen des isolierten C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p eingesetzt und die Reaktionen in An- und Abwesenheit von 100 μM Oleoyl-CoA bei 27 °C gemessen. (A) Radioaktive ATPase Messung der Proben in Doppelbestimmung (cpm: counts per minute). (B) Kolorimetrische ATPase Messung mit dem EnzChek Phosphat-Assay in Einfachbestimmung. (C) Kontrollmessungen bei der radioaktiven ATPase Messung. C-terminal epitopmarkiertes Pxa1p-Pxa2p (0,7 μg) wurde mit und ohne 5 mM MgCl_2 und unter Zugabe von 1 mM Berylliumfluorid inkubiert.

Beide Methoden zur Bestimmung der ATPase Aktivität sind unter 3.6.8 beschrieben. Die radioaktive ATPase Messung beruht auf der Freisetzung von $^{32}\text{P}_i$ aus $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Die Phosphationen werden nach der ATPase Reaktion durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln aus den Reaktionsansätzen extrahiert. Da die Reaktionsansätze außer den Substraten und den Proteinen keine weiteren Komponenten enthalten, können keine Nebenreaktionen zu einer scheinbaren ATPase Aktivität führen und es können Inhibitoren eingesetzt werden.

Die EnzChek Methode beruht auf einer enzymkatalysierten Reaktion des bei der ATP-Hydrolyse freigesetzten Phosphats, bei der ein Chromophor entsteht. Die Absorptionzunahme kann kontinuierlich spektrophotometrisch verfolgt werden und die ATPase Aktivität wird aus den linearen Anstiegen ermittelt. Die Methode ist deshalb besonders gut geeignet zum Nachweis geringer ATPase Aktivitäten und für Substrate mit einer Eigenabsorption. Sie kann jedoch nicht mit Hemmstoffen wie Berylliumfluorid, Na-Orthovanadat und Natriumazid kombiniert werden, da dies auch die Enzymreaktion stört, die zur Bildung des Chromophors führt. Der Vergleich der beiden Messmethoden in Abb. 33 Teil (A) und (B) zeigt eine große Übereinstimmung beider Messungen. In beiden Messungen wurde eine basale und eine stimulierte Aktivität unter Zugabe von Oleoyl-CoA gemessen, die abhängig von der Proteinkonzentration war. Coenzym A Ester langkettiger Fettsäuren stellen wahrscheinlich ein Transportsubstrat für Pxa1p-Pxa2p dar. Der Vergleich der Methoden zeigt deutlich die Zuverlässigkeit der nicht-radioaktiven ATPase Messung, die eine ähnliche Empfindlichkeit wie die radioaktive Messung aufweist. Die radioaktive Messung wurde ebenfalls ohne MgCl_2 und mit Zusatz von Berylliumfluorid durchgeführt. Diese Kontrollmessungen in Abb. 33 Teil (C) zeigen eine vollständige Hemmbarkeit der ATPase Aktivität. Dies gibt Hinweise darauf, dass die gemessene ATPase Aktivität mit Pxa1p-Pxa2p assoziiert ist.

Für alle weiteren ATPase Messungen wurde nur noch die nicht-radioaktive Methode verwendet, da sie neben der geringeren Personengefährdung noch den weiteren Vorteil aufweist, eine Lagerdauer von ca. 6 Monaten zu haben, anders als $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, das eine Halbwertszeit von ca. 2 Wochen besitzt. Mit der nicht-radioaktiven Methode konnten die ATPase Messungen in Zusammenhang mit den Aufreinigungsexperimenten als Qualitätskontrolle durchgeführt werden.

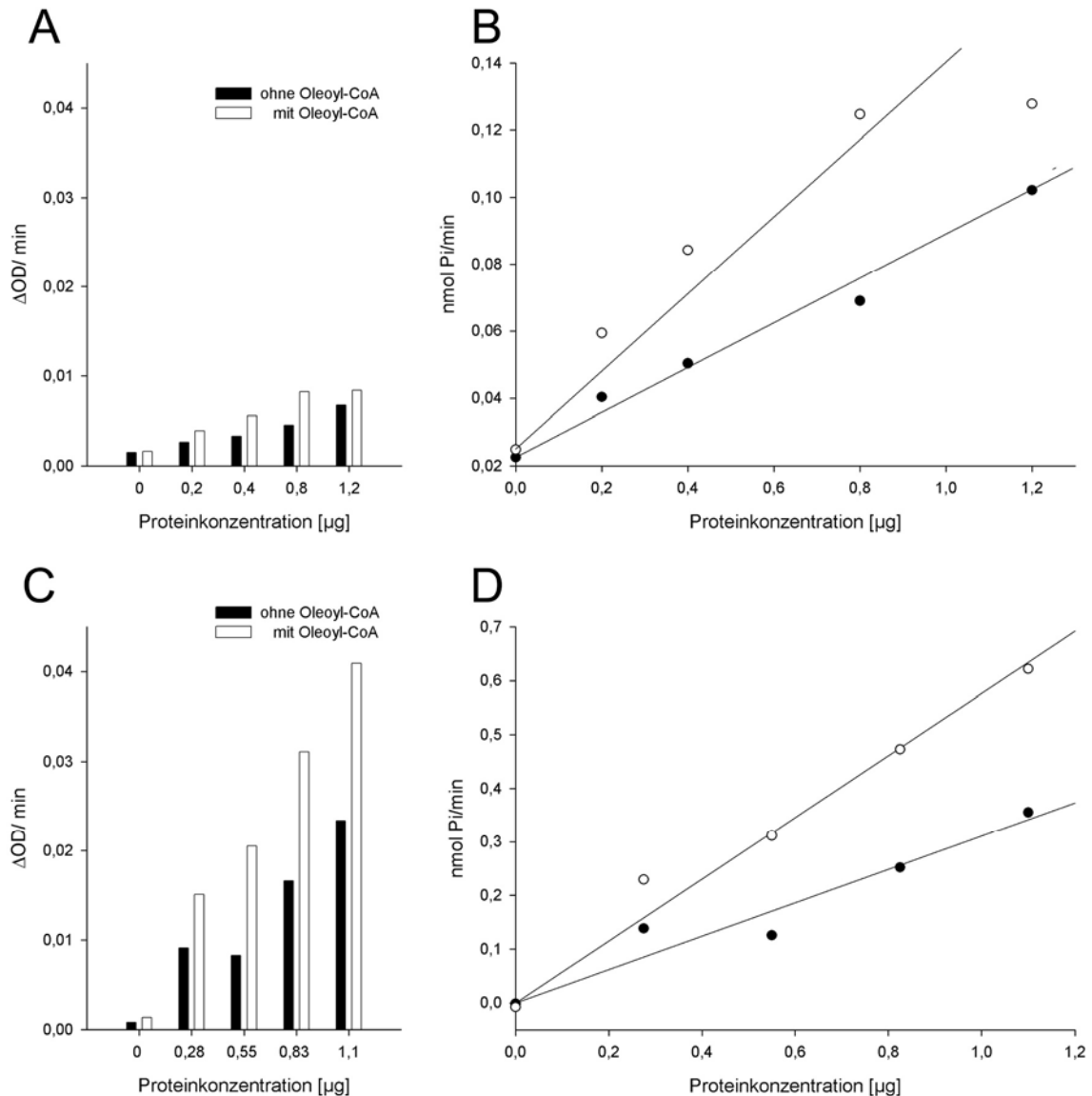


Abb. 34: Basale und Oleoyl-CoA stimulierbare ATPase Aktivität von DDM solubilisiertem Pxa1p-Pxa2p. (A) und (B) ATPase Einzelmessung mit aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p aus dem C-terminal epitopmarkierten ölsäureinduzierbaren Expressionssystem, die ATP Hydrolyserate unterschiedlicher Proteinkonzentrationen wurden +/- 100 μM Oleoyl-CoA gemessen (siehe Legende). (A) Lineare Absorptionszunahme (ΔOD) bei der kontinuierlichen Messung und (B) Errechnete ATP Hydrolyserate (nmol Pi/min) aus der Absorptionszunahme und einer Phosphateichgerade. (C) und (D) ATPase Einzelmessung mit aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p aus dem N-terminal epitopmarkierten galaktoseinduzierbaren Expressionssystem wie oben beschrieben.

In Abb. 34 sind basale und Oleoyl-CoA stimulierbare ATPase Aktivitäten des C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p in Teil (A) und (B) und des N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p in Teil (C) und (D) zu sehen. Es ist somit gelungen Pxa1p-Pxa2p aus beiden Expressionssystemen in aktiver Form zu isolieren, wobei die ATPase Aktivität des C-terminal markierten Pxa1p-Pxa2p in Teil (A) scheinbar deutlich niedriger ist als beim N-terminal markierten Pxa1p-Pxa2p in Teil (B). Die Balkendiagramme repräsentieren die Rohdaten, d.h. die Absorptionszunahme pro Minute bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Die Grafiken rechts zeigen die ATP Hydrolyserate unter Verwendung der Phosphateichkurve (siehe Abb. 14). Beide epitopmarkierten Mutanten zeigten eine stärkere ATPase Aktivität nach Zugabe von Oleoyl-CoA, was einen starken Hinweis darauf gibt, dass es sich bei Oleoyl-CoA tatsächlich um ein Transportsubstrat für Pxa1p-Pxa2p handelt. Die Ergebnisse der ATPase Aktivitätsbestimmung sind in Tab. 4 aufgelistet.

Tab. 4: ATPase Aktivität

	Basal ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Stimuliert* ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
C-terminal epitopmarkiert	0,087	0,15
N-terminal epitopmarkiert	0,27	0,49

* Zur Stimulierung wurde 100 μM Oleoyl-CoA verwendet

Die Basalaktivität des C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p ist um den Faktor 3,1 niedriger als die Basalaktivität des N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p. Es könnte sich dabei tatsächlich um einen Aktivitätsunterschied zwischen den N-terminal und den C-terminal markierten Konstrukten handeln oder es könnte in einer überschätzten Pxa1p-Pxa2p Konzentration begründet sein, die dadurch verursacht wurde, dass die Elutionsfraktionen des C-terminal epitopmarkierte Pxa1p-Pxa2p aufgrund der niedrigeren Expressionsrate stärker mit Begleitproteinen kontaminiert waren. Die Oleoyl-CoA Stimulierbarkeit der ATPase Aktivität ist bei beiden Konstrukten mit dem Faktor 1,8 und 1,7 sehr ähnlich.

In 4.2.6 wurde gezeigt, dass sich in den Proben der Affinitätsreinigung neben Pxa1p-Pxa2p noch andere ATP bindende Proteine finden. Um die ATPase Aktivität von Pxa1p-Pxa2p von möglichen kontaminierenden ATPasen abzugrenzen, wurden neben den bereits beschriebenen Analysen weitere Kontrollmessungen durchgeführt. Für die Messung in Abb. 35 wurde bei einer festen Proteinmenge ATP gegen ADP ausgetauscht und eine Messung in Abwesenheit von MgCl_2 durchgeführt. Die Messung ohne Transportsubstrat zeigt basale Aktivität, die durch Substratzugabe (Oleoyl-CoA) stimulierbar ist. Beide Kontrollmessungen ohne MgCl_2 bzw. ohne ATP ergaben keine messbare Aktivität, womit eine Kontamination mit einer magnesiumunabhängigen, hochaktiven nukleotidsplattendenden Phosphatase ausgeschlossen werden kann, die bei der Aufreinigung von Pdr5p aus *S. cerevisiae* eine scheinbare ATPase Aktivität simulierte (unveröffentlichte Ergebnisse von Robert Ernst, Universität Düsseldorf).

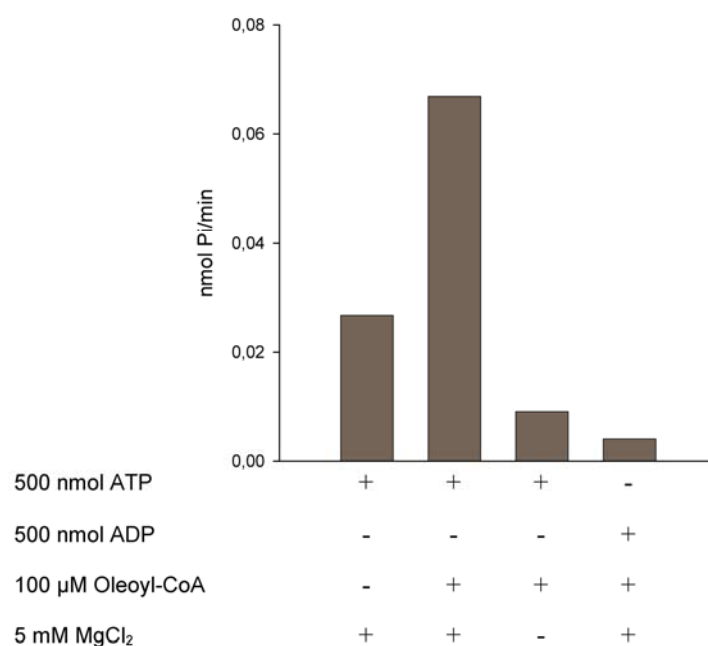


Abb. 35: Messung der ATPase Aktivität in Abwesenheit von MgCl_2 und Überprüfung der ADP Hydrolyserate. Einzelmessung der basalen und der Oleoyl-CoA stimulierten ATPase Aktivität mit 0,6 μg DDM solubilisiertem C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p als Referenzwerte für die Messungen ohne MgCl_2 und mit ADP statt ATP.

Als weitere Kontrolle wurden ATPase Messungen mit verschiedenen Fettsäure- und Coenzym A-Verbindungen durchgeführt, um potenzielle Transportsubstrate zu identifizieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 36 dargestellt, die eingesetzte Substratkonzentration betrug jeweils 100 μM . Neben den Acyl-CoA Estern Oleoyl-, Palmitoyl-, Caproyl-, und Acetyl-CoA wurden freie Ölsäure, Lyso-PC und Ei-PC eingesetzt.

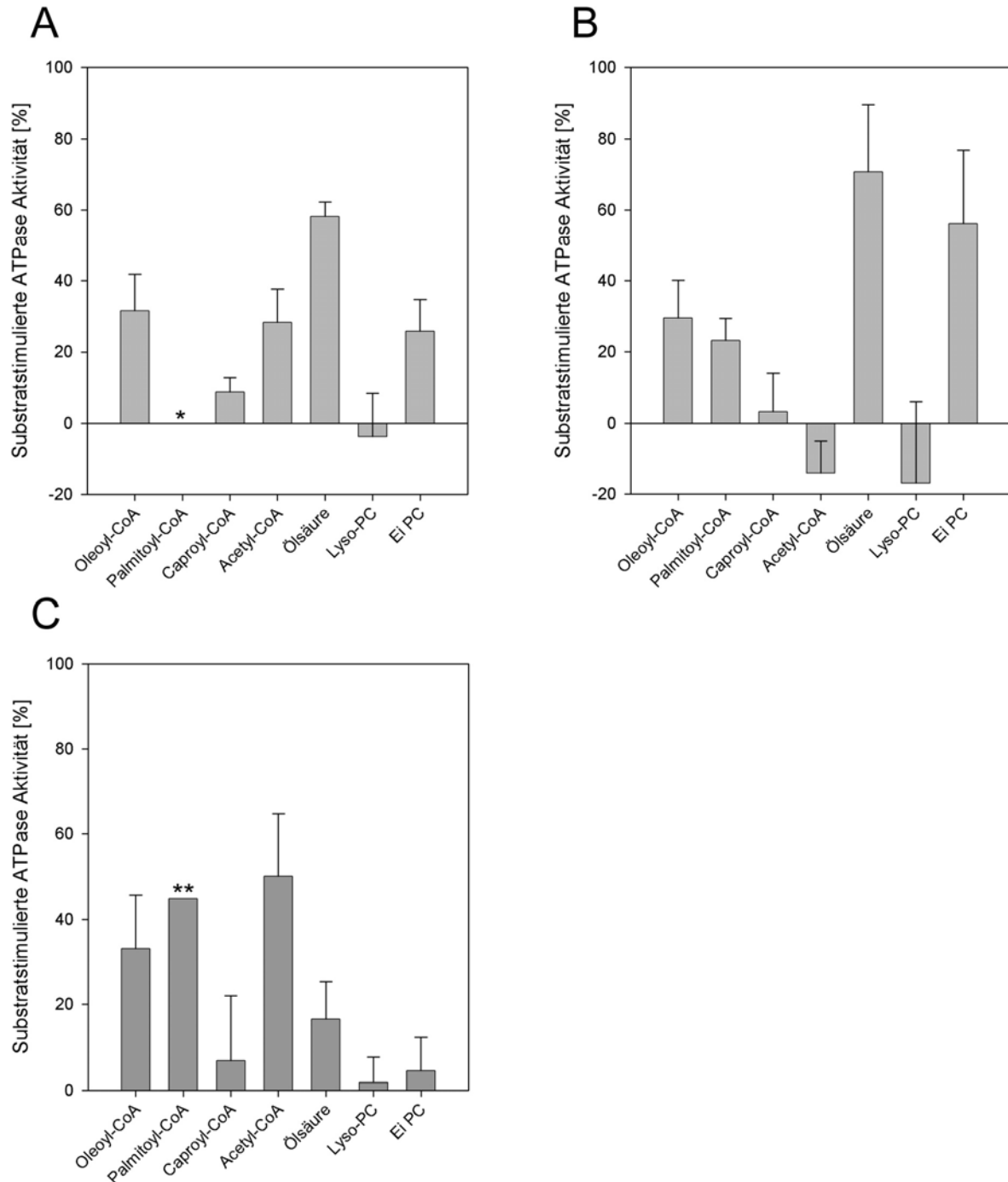


Abb. 36: Einfluss verschiedener potenzieller Substrate auf die ATPase Aktivitätsmessung verschiedener Präparationen des aufgereinigten, DDM solubilisierten, C- und N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p. Abbildung (A) und (B) Substratstimulierbarkeit des C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p. Es ist die prozentuale ATPase Stimulierbarkeit gegenüber der Basalaktivität von zwei unabhängigen Proteinpräparationen dargestellt. Es handelt sich jeweils um 3-fach Bestimmungen mit variiert Proteinkonzentration (* Messung fehlt). (A) 2 x 0,5 und 1 x 1 μg Protein und (B) 2 x 0,3 und 1 x 0,6 μg Protein. (C) 3-fach Messung des N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p aus dem galaktoseinduzierbaren Expressionssystem (**1-fach Messung). Es wurden 2 x 0,6 und 1 x 1,2 μg Protein eingesetzt. Die Substrate wurden in einer Konzentration von 100 μM eingesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In Abb. 36 sind die Ergebnisse von ATPase Aktivitätsmessungen unter Zugabe verschiedener Substrate dargestellt. Abb. 36 Teil (A) und (B) zeigt Messungen an zwei verschiedenen Proteinpräparationen des C-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p und Teil (C) eine Messung an dem N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p. Es handelt sich, soweit nicht anders vermerkt, jeweils um Dreifachmessungen nach Subtraktion der Basalaktivität, die auf 100% normiert wurde. Beide Messungen in (A) und (B) zeigen weitgehende Übereinstimmungen. Die höchste Stimulation wurde bei Zugabe freier Ölsäure und Ei-PC erzielt. In der Reihe Oleoyl-CoA (C18:1), Palmitoyl-CoA (C16:0), und Caproyl-CoA (C6:0) war die Stimulation abnehmend und Lyso-PC hatte keinen stimulierenden Einfluss. Keine Übereinstimmung war bei Acetyl-CoA zu beobachten, während in Teil (A) eine stimulierte Aktivität vorlag, zeigt sich in Teil (B) eine Hemmung, woraus zumindest auf die Teilaktivität einer Kontamination geschlossen werden kann.

Der Vergleich der ATPase Aktivität der C-terminal epitopmarkierten Halbtransporter in (A) und (B) mit den N-terminal markierten Halbtransportern in Abb. 36 Teil (C) weist noch größere Unterschiede auf. Während bei Oleoyl-CoA, Palmitoyl-CoA und Caproyl-CoA wiederum eine ganz ähnliche Substratstimulierbarkeit auftrat und bei Lyso-PC in allen drei Grafiken keine Stimulierbarkeit zu verzeichnen war, waren die Ergebnisse für Acetyl-CoA, Ölsäure und Ei-PC konträr. Acetyl-CoA Zugabe führte beim N-terminal markierten Pxa1p-Pxa2p zu der stärksten Stimulation der ATPase Aktivität, während die Ei-PC Zugabe zu keiner stimulierten ATPase Aktivität führte und Ölsäure nur gering stimulierenden Einfluss hatte. Beide Substrate stimulierten beim C-terminal markierten Pxa1p-Pxa2p die ATPase Aktivität massiv.

Die Proteinaktivität kann durch die Epitoplokalisierung beeinflusst sein, bei sterischer Behinderung der korrekten Faltung oder der Interaktion können Proteine durch die Epitopmarkierung inaktiviert werden. Ein Einfluss der Epitoplokalisierung auf die Substratstimulierbarkeit eines aktiven und korrekt gefalteten Proteins ist jedoch unwahrscheinlich, weshalb die Substrate mit widersprüchlicher Stimulierbarkeit eher, zumindest anteilig, auf die P_i Freisetzung von kontaminierenden Proteinen zurückzuführen sind. Die einzigen stimulierenden Substrate ohne widersprüchliche Ergebnisse waren Oleoyl-CoA und Palmitoyl-CoA, beide sind Coenzym A Ester langkettiger Fettsäuren und damit erwartete Substrate. Caproyl-CoA ist ein Coenzym A Ester einer kurzkettigen Fettsäure und stimulierte nicht, ebenfalls wie erwartet. Anders sah es bei der freien Ölsäure aus, dort gab es graduell unterschiedliche Ergebnisse. Freie Ölsäure stimulierte bei allen Proben die ATPase Aktivität, teilweise jedoch nur mäßig (Teil (C)) und teilweise maximal (Teil (A) und (B)). Wäre diese Aktivität tatsächlich auf Pxa1p-Pxa2p zurückzuführen, wäre das Ergebnis unerwartet und gäbe Hinweise bezüglich der Substraterkennung. Die Sicherung der Ergebnisse könnte über den Vergleich mit einer Kontrolle ohne ATPase Aktivität (ATPase dead Mutante) oder durch Einsatz von Hemmstoffen durchgeführt werden. Ohne diese Kontrollen gibt es keine Möglichkeit, die Aktivität von ABC-Transportern gegenüber Kontaminationen abzugrenzen, da die ATP Bindung teilweise auf Proteine zurückzuführen war, die in so niedriger Konzentration vorkamen, dass sie in der Coomassie-Blau Färbung nicht sichtbar waren (siehe 4.2.6), so dass auch eine bessere Aufreinigung nicht zur Abgrenzung ausgereicht hätte.

ATPase Dead Mutanten

Als Kontrollen für die ATPase Aktivitätsmessung und für Transportuntersuchungen sollten „ATPase dead“ Mutanten ohne ATPase Aktivität kloniert werden. Als geeigneter Mutationsort wurde das hochkonservierte Walker A Motiv innerhalb der nukleotidbindenden Domäne gewählt (siehe Abb. 5 und Anhang Abb. 51). Es hat in Pxa1p

und Pxa2p die Sequenz GPNGCKSS. Zur Klonierung inaktiver Mutanten wurde die positiv geladene AS Lysin (K) gegen die negativ geladene AS Glutaminsäure (E) ausgetauscht.

In Abb. 37 Teil (A) ist die Domänenstruktur von Pxa1p und Pxa2p skizziert. Die nukleotidbindende Domäne (NBD) von ABC-Transportern enthält die hochkonservierten Walker A und Walker B Motive und die C- H- und D-Loops. Strukturelle- und biochemische Daten beweisen, dass die ATP Bindung die Dimerisierung der NBD-Domäne in einer Kopf zu Schwanz Orientierung induziert, was zu ein Struktur führt, bei der das ATP im Dimer eingeklemmt ist. Beide nukleotidbindenden Strukturen sind geformt aus dem Walker A und Walker B Motiv der einen NBD und dem C-Loop der anderen NBD [37]. Wegen der unmittelbaren Beteiligung an der ATP Bindung wurde das Walker A Motiv als Mutationsstelle ausgewählt und die positiv geladene AS Lysin gegen die negativ geladene AS Glutamat ausgetauscht (Pxa1p K650E; Pxa2p K510E).

Die Mutationen wurden von Michael Schneider durch Mutations-PCR in die Expressionsplasmide pMSC49 und pMSC52 eingeführt. Die modifizierten Plasmide pMSC69 (Pxa1p (K650E)-(His)₆) und pMSC70 (Pxa2p (K510E)-FLAG) wurden in verschiedenen Kombinationen in der *S. cerevisiae* Doppeldeletionsmutante BJ1991 $pxa1\Delta pxa2\Delta$ exprimiert. Der Aktivitätstest auf Ölsäuremedium in Abb. 37 Teil (B) zeigt, dass die Mutation im Walker A Motiv von Pxa1p keinen negativen Einfluss auf die Verwertbarkeit von Ölsäure hatte, während die Mutation im Walker A Motiv von Pxa2p zu einem retardierten Wachstum führte, ähnlich wie bei der Doppeldeletionsmutante mit verlangsamtem Wachstum ohne Halobildung. Der transformierte Stamm mit beiden Walker A Mutationen zeigte gleiches Wachstumsverhalten wie der Stamm mit Walker A Mutation in Pxa2p.

Die Kultivierung und Aufreinigung der Einfachmutanten wurde wie unter 3.6.5 beschrieben durchgeführt. Das Wachstumsverhalten und die Ausbeute unterschieden sich nicht signifikant vom Wildtyp (pMSC49 + 52). Die Banden in den SDS-Gelen bei den aufgereinigten Mutanten in Abb. 37 Teil (C) haben eine vergleichbare Intensität wie bei der Wildtypkontrolle, woraus eine ähnliche Stabilität der mutierten Pxa1p-Pxa2p Dimere abgeleitet werden kann.

Für beide Mutanten wurde die ATP-Hydrolyserate ermittelt. Tab. 5 zeigt die Ergebnisse im Vergleich mit dem C-terminal epitopmarkierten Wildtypprotein.

Tab. 5: ATPase Aktivität der C-terminal epitopmarkierten Einfachmutanten und des C-terminal markierten Wildtyps

Expressionsplasmide	Genotyp	ATPase Aktivität basal ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	ATPase Aktivität stimuliert ($\mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
pMSC49 + 52	Pxa1p WT Pxa2p WT	0,087	0,15
pMSC49 + 69	Pxa1p Mut Pxa2p WT	0,072	0,213
PMSC70 + 52	Pxa1p WT Pxa2p Mut	0,15	0,29

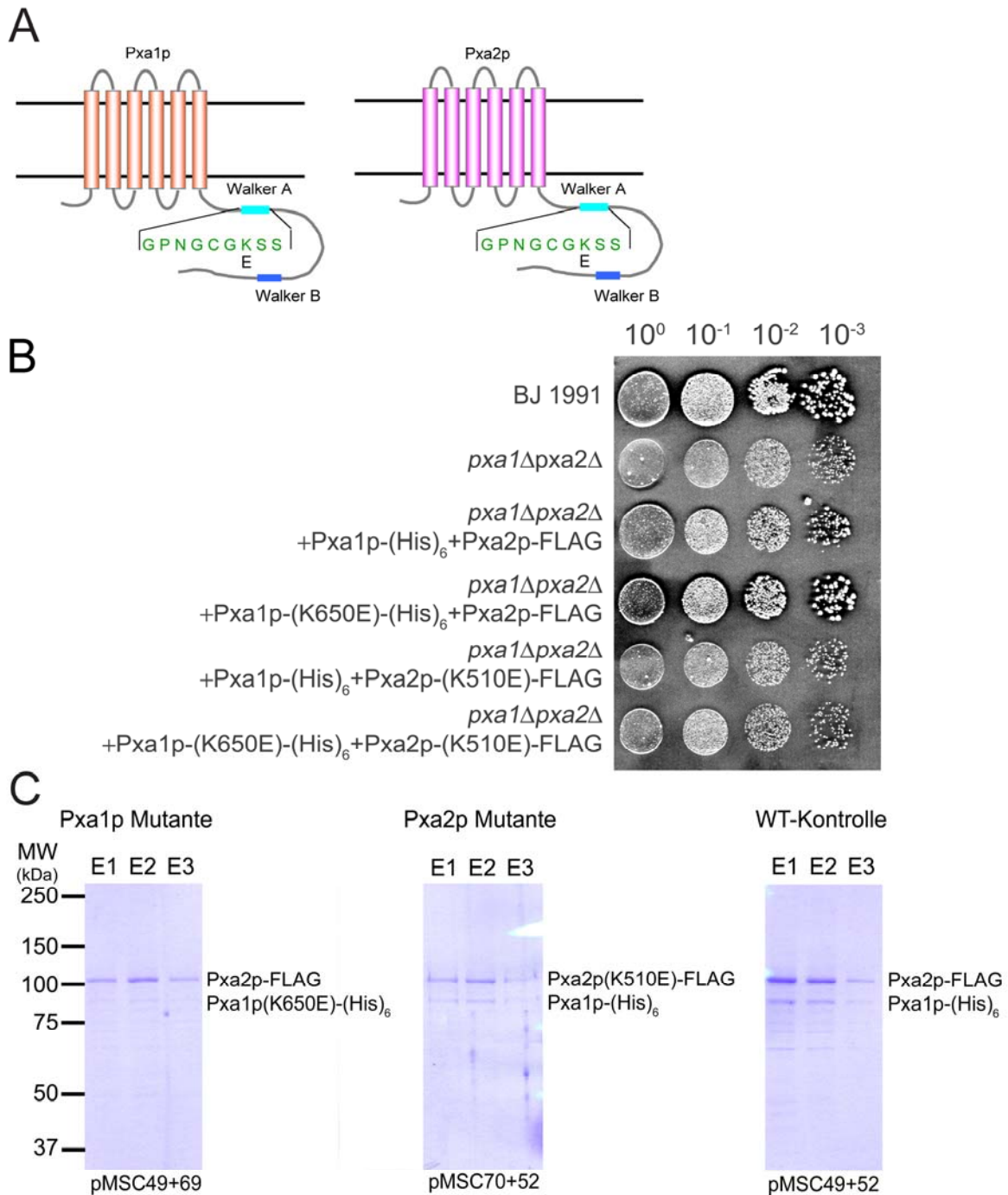


Abb. 37 (A) Skizze der Domänenstruktur von Pxa1p und Pxa2p mit Proteinsequenz der Walker A Domäne und Aminosäureaustausch von K (Lysin) zu E (Glutaminsäure). (B) Wachstumsverhalten auf Festmedium mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle. Die angezeigten Stämme wurden in dekadischen Verdünnungsreihen auf die Platten pipettiert und für 4 Wochen bei 30 °C inkubiert. Die Koloniedichte und die Halobildung, d.h. die Aufklärung des Mediums durch Entzug der trüben Ölsäure reflektieren die Ölsäurekatabolisierung der Mutantenstämme im Vergleich zum Wildtypstamm BJ 1991, der Doppeldeletionsmutante *pxa1Δpxa2Δ* und der Doppeldeletionsmutante transformiert mit Plasmiden, die für Pxa1p und Pxa2p als Fusionsproteine kodieren. (C) SDS-PAGE mit 12%igem SDS-Gel und Coomassie-Blau Färbung der ersten drei Elutionsfraktionen E1 - E3 der vektorkodierten C-terminal epitopmarkierten Pxa1p und der Pxa2p Mutante jeweils mit dem nicht mutierten epitopmarkierten Wildtyppartner exprimiert und der C-terminal epitopmarkierten Wildtypkontrolle.

Die ATP-Hydrolyseraten der Mutanten waren gegenüber dem Wildtyp nicht verringert. Der Aminosäureaustausch im Walker A Motiv hatte bei beiden Mutanten im Walker A Motiv nicht den erwarteten Effekt. Das Ergebnis für die Walker A Mutation in Pxa1p stimmt mit dem Wachstumstest überein, da dort eher verstärktes Wachstum der Mutante auf Ölsäuremedium zu sehen war. Für die Mutation im Walker A Motiv von Pxa2p lieferten der Wachstumstest und die ATPase Aktivitätsmessung widersprüchliche Ergebnisse. Sowohl die basale als auch die substratstimulierte ATPase Aktivität überstieg beide Vergleichsproben, obwohl das Wachstumsverhalten ähnlich retardiert war wie bei der Doppeldeletionsmutante *pxa1Δ pxa2Δ*. Die Interpretation des Ergebnisses ist nicht trivial. Die Entkopplung der ATPase Aktivität von der Transportaktivität wurde bereits für andere ABC-Transporter beschrieben und eine Stimulation durch Substrate die nachweislich keine Transportsubstrate sind wurde ebenfalls schon gezeigt [72]. Die allgemeine Modellvorstellung der ATP Bindung der Nukleotidbindenden Domäne ist jedoch schwer mit dem Ergebnis in Einklang zu bringen. Das Lysin in der Walker A Domäne hat nach der Modellvorstellung Wechselwirkungen mit dem β und γ -Phosphat von ATP und koordiniert das katalytische Wassermolekül in der ATP Bindungstasche (siehe 1.2.2).

Die unverminderte ATPase Aktivität der Walker A Mutante von Pxa2p bei aufgehobener Transportfunktion ist ein überaus interessantes Ergebnis, dass weitere Analysen erfordert. Es liefert Hinweise, dass es von der gängigen Modellvorstellung, wie die ATP Hydrolyse mit der Transportaktivität von ABC-Transportern verknüpft ist, Abweichungen geben könnte.

4.3 Transportmessungen

4.3.1 Synthese und Aufreinigung von SL-Oleoyl-Coenzym A

Natürliche Fettsäuren und Fettsäure-CoA Ester ohne Reportergruppe, wie z.B. eine fluoreszierende oder eine paramagnetische Gruppe, können in Transportmessungen nur indirekt detektiert werden, beispielsweise über pH-Wert- oder Ladungsänderungen oder über Formveränderungen von GUVs (siehe Abb. 48). Im Gegensatz dazu erlauben Reportergruppen die direkte Verfolgung der Fettsäureanaloge. Transportmessungen unter Verwendung dieser Analoga beruhen überwiegend darauf, ein Signal in der äußeren Schicht einer Doppelmembran zu löschen und im Inneren einen geschützten Pool zu bewahren, dessen Anteil einen Rückschluss auf den Transportvorgang zulässt.

Um eine detektierbare Ölsäure bzw. den Oleoyl-CoA Ester herzustellen, wurde von Dr. Anne-Katrin Windeck Ölsäure mit einer paramagnetischen Doxylgruppe in C16 Position der Alkylgruppe in einer noch unpublizierten [62]dreistufigen Retrosynthese synthetisiert. Diese SL-Ölsäure wurde wie unter 3.6.9 beschrieben mit Coenzym A kovalent verbunden. Zur Analyse wurde eine semipräparative HPLC mit einer Eurospher 100 C₈-RP-Säule und Acetonitril/Ammoniumacetatpuffer wie unter 3.6.9 beschrieben durchgeführt [42]. Abb. 38 zeigt die Strukturformel von SL-Oleoyl-CoA sowie ein HPLC-Spektrum und das erhaltene „electrospray ionization“-Massenspektrum (ESI-MS), das die Substanz verifiziert. Die massenspektrometrische Analytik wurde von Dr. Jürgen Schiller an der Universität Leipzig durchgeführt.

Nach demselben Reaktionsprotokoll wie bei der Ölsäure wurde auch SL-Stearinsäure (Sigma) mit Coenzym A verknüpft. Die präparative Aufreinigung der Coenzym A Ester wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf einer Zellulosematrix durchgeführt [62].

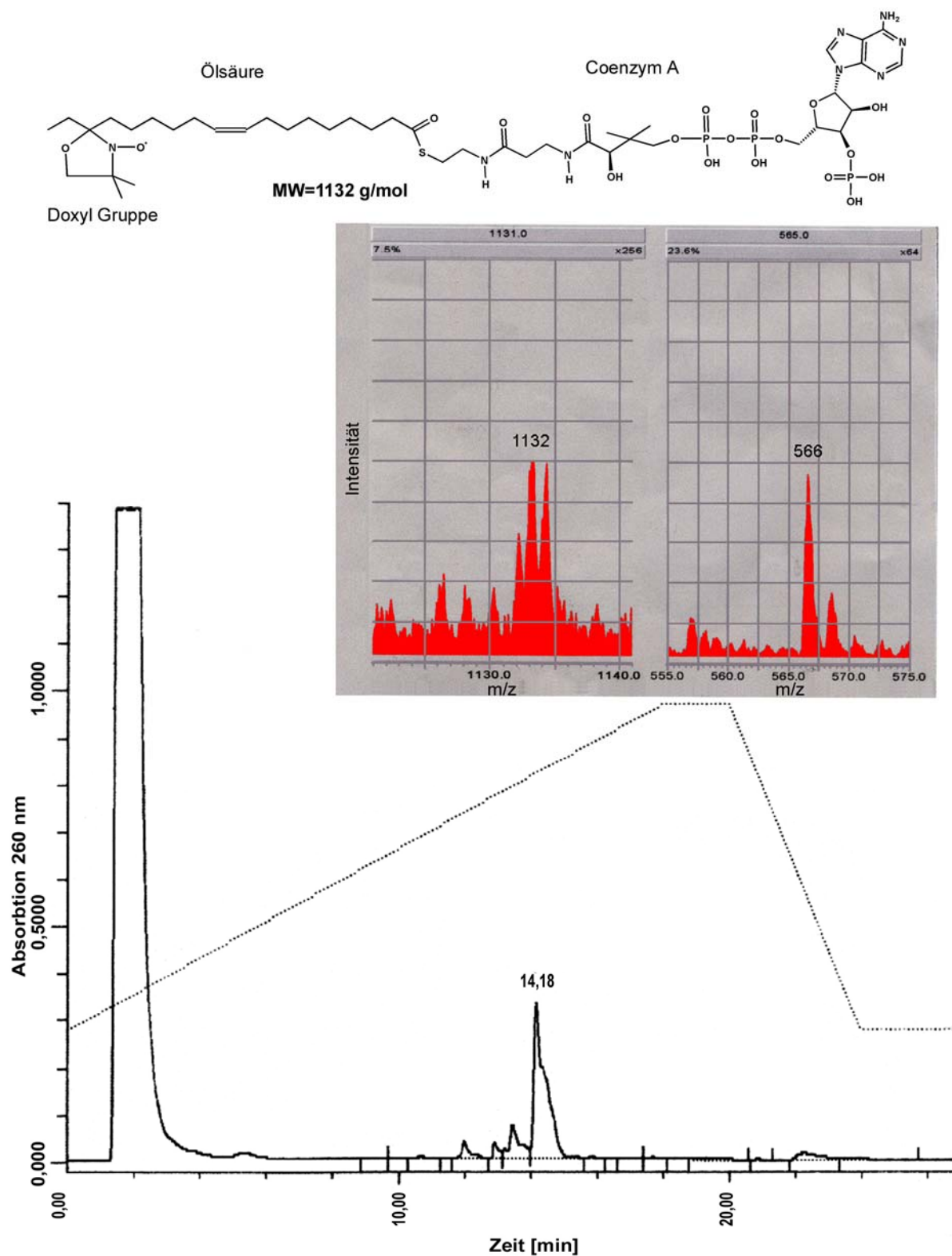


Abb. 38: Strukturformel von SL-Oleoyl-CoA mit paramagnetischer Doxylgruppe am Ende der Fettsäure in C16 Position, Molekulargewicht = 1132 g/mol. HPLC-Spektrum der Aufreinigung mit Elutionspeak von SL-Oleoyl-CoA bei 14,18 min und Analyse dieses Elutionspeaks mit ESI-MS. Die gepunktete Linie im HPLC-Spektrum repräsentiert den Ammoniumacetatpuffer/Acetonitril Gradienten (20 – 50%). Im grau unterlegten ESI-Spektrum sind die Intensitäten gegen Masse zu Ladung (m/z) aufgetragen, es wurde der Molpeak mit einfacher Ladung bei 1132 g/mol und der zweifachgeladene Peak mit 566 g/mol detektiert.

4.3.2 Überprüfung der biologischen Aktivität von SL-Oleoyl-CoA

Zur Überprüfung der biologischen Verwertbarkeit des Oleoyl-CoA Analogons mit Spinlabel wurden zwei verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Es wurde in einer Untersuchung der substratstimulierten ATPase Aktivität von aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p eingesetzt und es wurde als Substrat der Acyl-CoA Oxidase aus *Candida sp.* (Sigma P6782) in einer kolorimetrischen Messung untersucht. Bei der substratstimulierten ATP Hydrolyse von ABC-Transportern wird das zu transportierende Substrat nicht modifiziert. Es muss jedoch von der Substraterkennungsstelle, die wahrscheinlich von den Transmembranhelices gebildet wird, erkannt werden, damit in einer konzertierten Aktion eine Konformationsänderung und die Hydrolyse von ATP abläuft.

Die Acyl-CoA Oxidase Reaktion ist der erste Schritt der peroxisomalen β -Oxidation. Dabei wird eine Doppelbindung in die Coenzym A aktivierte Fettsäure eingeführt und die dabei freiwerdenden Wasserstoffatome auf Sauerstoff übertragen. Die Acyl-CoA Oxidase Messung wurde von Michael Schneider wie unter 4.3.2 beschrieben durchgeführt.

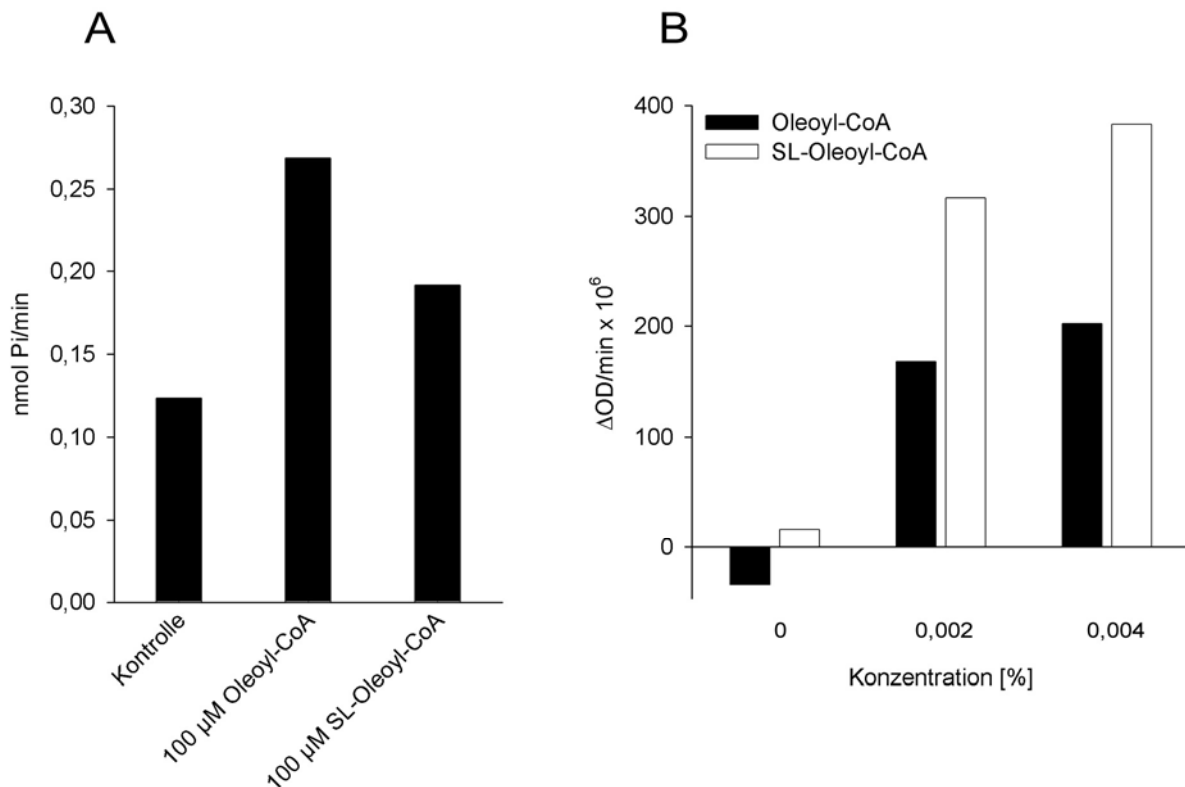


Abb. 39: Überprüfung der biologischen Aktivität des Oleoyl-CoA Analogons mit Spinlabel (SL) im Vergleich mit Oleoyl-CoA ohne Doxylgruppe und einer Kontrolle ohne Substrat in zwei verschiedenen Reaktionen. (A) ATPase Messung mit 2 µg DDM solubilisiertem C-terminal epitopmarkiertem Pxa1p-Pxa2p. Die basale ATPase Aktivität der Kontrolle ohne Substrat kann sowohl durch Oleoyl-CoA als auch durch das Analogon mit SL stimuliert werden. (B) Acyl-CoA Oxidase Messung mit je 1×10^{-3} U Acyl-CoA Oxidase (Sigma A 2903 aus *Candida sp.*), einem peroxisomalen β -Oxidationsenzym. Die enzymkatalysierte Oxidation und Einfügung einer Doppelbindung in die Alkylkette von SL-Oleoyl-CoA (schwarz) ist gegenüber Oleoyl-CoA ohne Doxylgruppe (weiß) nicht inhibiert. Die Unterschiede zwischen den Substraten in beiden Messungen liegen innerhalb der üblichen Schwankungsbreite von Wiederholungsmessungen.

Die ATPase Aktivität von aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p konnte, wie in Abb. 39 Teil (A) gezeigt wird, sowohl durch Oleoyl-CoA als auch durch SL-Oleoyl-CoA stimuliert werden. Die geringere Stimulationsrate von SL-Oleoyl-CoA war wahrscheinlich auf Konzentrationsunterschiede der Stammlösungen zurückzuführen. Die stimulierbare ATPase Aktivität ist ein sehr starker Hinweis darauf, dass SL-Oleoyl-CoA von Pxa1p-Pxa2p als Transportsubstrat erkannt wird. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Acyl-CoA Oxidase Messung in Abb. 39 Teil (B). Das Enzym aus der Hefe *Candida sp.* ist homolog zum Enzym in *S. cerevisiae* und die Erkennung von SL-Oleoyl-CoA als Substrat ist ein weiterer Hinweis auf die biologische Aktivität, wobei die Substraterkennung unterschiedlicher Proteine nicht über dieselben Wechselwirkungen verlaufen muss.

4.3.3 Analyse des Einbauverhaltens in Liposomen

Die Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR) ermöglicht neben der Detektion der Signalstärke Rückschlüsse auf die lokale Beweglichkeit des Labels in Biomolekülen und erlaubt dadurch eine Beurteilung der Umgebung der Fettsäureanaloge. So ist die Beweglichkeit in wässrigen Lösungen deutlich größer als in Modellmembranen, was Rückschlüsse auf die Einbaurate der Fettsäureanaloge zulässt.

In Abb. 40 Teil (A) ist ein mobiles Spektrum von SL-Oleoyl-CoA in wässriger Lösung und in Teil (B) ein immobiles Spektrum in Membranen gezeigt. Beim Membranspektrum sind die Peaks typischerweise verbreitert und der Hochfeldpeak verkürzt sich gegenüber dem isotropen mobilen Spektrum in Lösung, bei dem die drei Peaks ungefähr gleiche Größe haben. Bei einem partiellen Einbau in Membranen überlagern sich beide Spektralformen und die freie Komponente ist vor allem durch einen Anstieg des Hochfeldpeaks erkennbar.

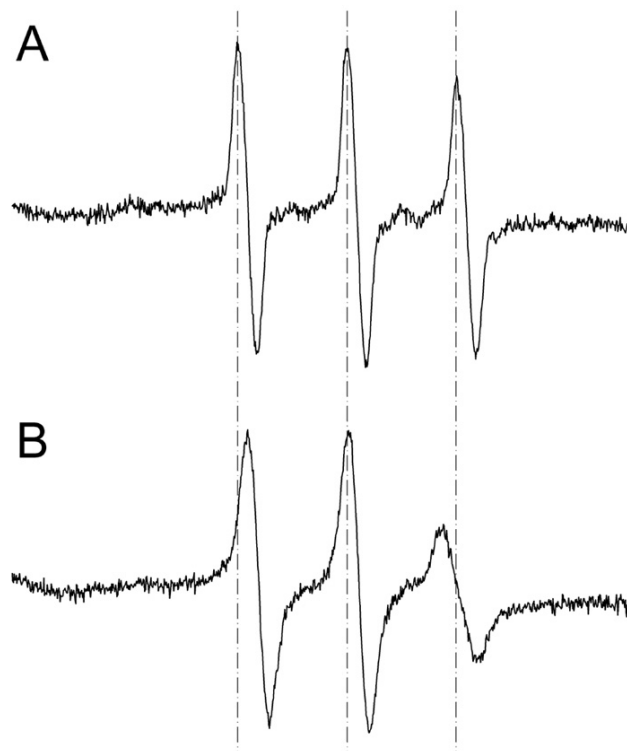


Abb. 40: Unterschiedliche Form der ESR-Spektren von SL-Oleoyl-CoA in wässriger Umgebung und in Modellmembranen (16-fache Akkumulation). (A) Mobiles Spektrum mit drei schmalen ungefähr gleichgroßen Peaks von 20 μM SL-Oleoyl-CoA in Puffer (5 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7,4). (B) Immobiles Spektrum von 20 μM SL-Oleoyl-CoA (2 mol%) in symmetrisch markierten Ei-PC LUVs. Der Tieffeld- und der Mittelfeldpeak sind etwas verbreitert, während der Hochfeldpeak stark verbreitert und massiv verkürzt ist. Der Tieffeld- und der Hochfeldpeak sind gegenüber dem mobilen Spektrum verschoben.

4.3.4 Transversale Beweglichkeit der Fettsäureanaloga in Membranen

Um den Flip-flop der CoA aktivierten und der freien Fettsäureanaloga in Membranen zu untersuchen, wurden symmetrisch markierte LUVs (Large unilamellar vesicles) wie in Abschnitt 3.6.10 beschrieben hergestellt. Die LUVs wurden für ESR-spektroskopische Messungen verwendet, die Rückschlüsse auf die Transversalbewegung der Sonden in den Membranen zulassen. Die markierten Fettsäuren bzw. CoA-Analoga wurden vor der Herstellung der LUVs zugegeben, so dass initial eine Gleichverteilung zwischen beiden Schichten der Doppelmembran vorhanden war. Durch Zugabe von Ascorbinsäure kann das Signal in der äußeren Schicht gelöscht werden, während die Sonden im Innern geschützt sein sollten. Bei Molekülen ohne oder mit sehr langsamem Flip-flop kann daher nur ~50% des Signals gelöscht werden, während es bei schnellem Flip-flop der Sonden zu einem vollständigen Signalverlust kommt.

Abb. 41 Teil (A) zeigt exemplarisch, anhand symmetrisch mit SL-Palmitoyl-C₅-PC markierten Ei-PC LUVs, die Veränderung von ESR Spektren nach Extraktion der Sonde mit BSA und gleichzeitiger Reduktion der Doxylgruppe mit Ascorbinsäure. Teil (B) zeigt die erhaltenen Reduktionskinetiken von SL-Oleoyl-CoA und SL-Stearoyl-CoA und den korrespondierenden freien Fettsäuren. Zusätzlich ist eine Kontrollkinetik mit SL-Palmitoyl-C₅-PC gezeigt. Ei-PC und seine Analoga machen keinen Flip-flop, sie sind nicht in der Lage sich spontan und frei zwischen den Membranschichten zu bewegen [58]. Die Reduktionskinetiken zeigen einen schnellen Abfall innerhalb der ersten beiden Minuten, der jedoch mit der Methode zeitlich nicht auflösbar ist, und einen langsamen Abfall. Der langsame Abfall ist ebenfalls, wenn auch abgeschwächt, bei der C₅-PC Kontrolle erkennbar, weshalb der langsame Abfall auf die Permeation der Vesikel durch Ascorbinsäure zurückgeführt wurde. Bei C₅-PC bleibt das Signal nach BSA und Ascorbinsäure Zugabe zu ~50% erhalten, dies entspricht der halben Sondenkonzentration, die im Innern der Vesikel geschützt ist. Bei Oleoyl-CoA und Stearoyl-CoA bleibt das Signal nur zu ~40% erhalten. Dies zeigt, dass die CoA aktivierten Fettsäureanaloga mit der großen hydrophilen Kopfgruppe nur sehr langsam flippen, da sonst das Signal vollständig gelöscht würde. Das geringere Restsignal ist wahrscheinlich auf Verunreinigungen mit den freien Fettsäuren zurückzuführen, die wie die Abbildung ebenfalls zeigt, eine schnelle Transversalbewegung (Flip-flop) ausführen, da das Signal innerhalb der ersten beiden Minuten fast vollständig gelöscht werden kann.

Zwischen den beiden Fettsäuren Ölsäure und Stearinsäure bzw. deren CoA Thioestern gibt es keinen signifikanten Unterschied im Flip-flop Verhalten. Da typischerweise in Untersuchungen zum Fettsäurestoffwechsel von Hefen ausschließlich Ölsäure verwendet wird, wurde in weiteren Messungen das Ölsäurederivat verwendet.

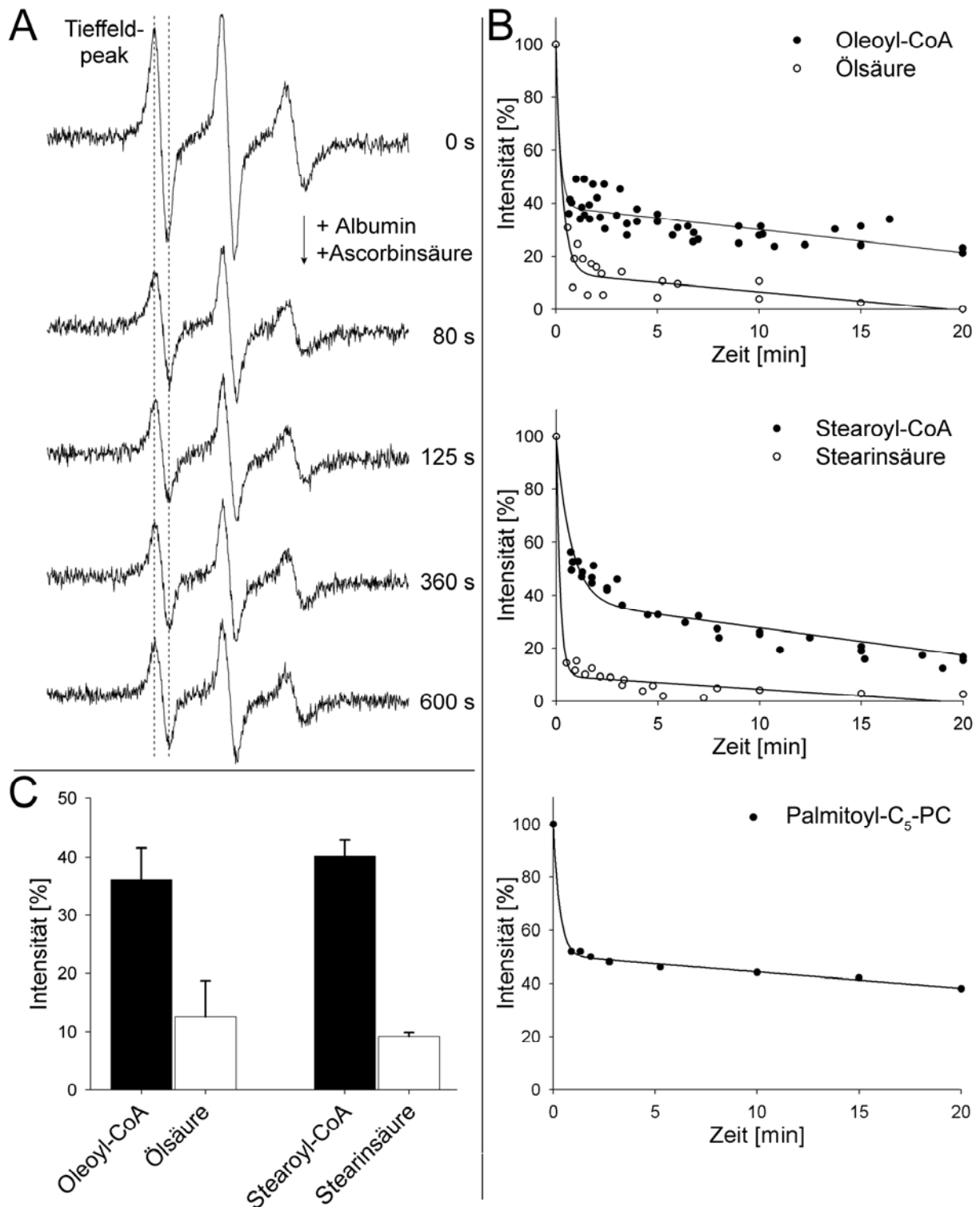


Abb. 41: Transversale Beweglichkeit der Ölsäure und Stearinsäure Analoga und einer SL-Palmitoyl-C₅-PC Kontrolle in symmetrisch markierten 1 mM Ei-PC LUVs mit 2 mol% SL-Analoga. (A) Veränderung des initialen ESR-Spektrums von SL-Palmitoyl-C₅-PC LUVs nach Zugabe von BSA und Ascorbinsäure mit zunehmender Zeit zur exemplarischen Verdeutlichung der Auswertung. Die Höhe des Tieffeldpeaks sinkt nach Zugabe von BSA und Ascorbinsäure mit der Inkubationsdauer. (B) Grafische Auftragung der normierten Intensitäten (Initial = 100%) als Funktionen der Zeit. SL-Oleoyl-CoA und SL-Ölsäure (oben) in Vierfach- bzw. Doppelbestimmungen mit gemittelten Ausgleichsfunktionen (siehe 3.6.11). SL-Stearoyl-CoA und SL-Stearinsäure (mitte) in Dreifach- bzw. Doppelbestimmung und SL-Palmitoyl-C₅-PC (unten) in Einfachbestimmung als Kontrolle des Einflusses von Ascorbinsäure und BSA auf die Integrität der Vesikel. (C) Signalintensitäten der Fettsäureanaloga mit den Standardabweichungen nach zwei Minuten abgetragen aus den Signalreduktionskinetiken der Einzelmessungen.

4.3.5 Proteoliposomen

Wie im vorangehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, führt SL-Oleoyl-CoA in reinen PC-Vesikeln nur einen sehr langsamen Flip-flop aus. Da die aktivierten Ölsäure Coenzym A Ester *in vivo* jedoch in die membranumhüllten Peroxisomen gelangen müssen, da sie dort abgebaut werden, wurde ein proteinabhängiger Mechanismus postuliert, der wahrscheinlich auf einem aktiven Transport langkettiger Acyl-CoA Ester durch den ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p beruht. Sämtliche bisherige Ergebnisse beruhen auf genetischen und biochemischen Untersuchungen. In dieser Arbeit sollte erstmals der direkte Transport von aktivierter Ölsäure in Proteoliposomen mit rekonstituierten ABC-Transportern Pxa1p-Pxa2p untersucht werden.

Die Rekonstitution von detergenssolubilisiertem Pxa1p-Pxa2p aus der FLAG-Affinitätsaufreinigung in Ei-PC Vesikel wurde wie unter 3.6.12 beschrieben durchgeführt. Die Elutionsfraktionen der Affinitätsaufreinigung mit 20% Glycerin wurden ohne weitere Aufkonzentrierung für die Rekonstitution verwendet, da selbst geringe Konzentrierungsstufen schon zur völligen Inaktivierung der ATPase Aktivität führten (Daten nicht gezeigt). Hierdurch war allerdings die Proteinmenge, die für die Rekonstitutionen eingesetzt werden konnte, limitiert. Die Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen, die für die Rekonstitution verwendet wurden, lagen für das Ölsäure induzierbare C-terminal epitopmarkierte Konstrukt zwischen 30 und 50 µg/ml und für das galaktoseinduzierbare N-terminal markierte Konstrukt zwischen 50 und 120 µg/ml. Von diesen Proteinlösungen wurden maximal 500 µl für einen Rekonstitutionsansatz verwendet. Bei der Annahme, dass sich 100% des eingesetzten Proteins in den Proteoliposomen wiederfindet, und 10% der Ansätze für einen Proteinnachweis zur Verfügung stünden, lag die nachzuweisende Proteinmenge zwischen 1,5 und 2,5 µg C-terminal markierten Proteins und zwischen 2,5 und 6 µg N-terminal markierten Proteins. Diese Proteinmengen liegen noch innerhalb der Nachweisgrenze des micro BCA Assays (10-40 µg/ml in einem 150 µl Ansatz). Lassen sich jedoch beispielsweise nur 10% des eingesetzten Proteins in den Vesikeln wiederfinden, oder Protein geht bei der Fällung verloren, dann ist die Proteinmenge jenseits der Nachweisgrenze des micro BCA Assays. Die Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden mit verschiedenen Methoden durchgeführt: der micro BCA Methode nach vorheriger DOC/TCA Fällung (siehe 3.6.13) und einer speziellen Amido-Black Färbung für Proteoliposomen mit vorheriger Fällung und Filtration des Proteinpräzipitats [41]. Mit keiner der Methoden gelang es, sinnvolle Proteinkonzentrationen in den Proteoliposomen zu bestimmen, weshalb auch darauf verzichtet wurde, die Lipidkonzentration zu bestimmen.

Als sensitivere Nachweismöglichkeit von Proteinen in Proteoliposomen gibt es die SDS-PAGE mit Immunodetektion. Proteoliposomen mit höherem Protein/Lipid Verhältnis werden teilweise direkt ohne Fällung für die SDS-PAGE eingesetzt [3]. Bei Proteoliposomen mit niedrigem Protein/Lipid Verhältnis müssten sehr große Volumina mit sehr viel Lipid auf die Gele geladen werden, wodurch keine scharfe Bandentrennung erzielt werden kann. Aus diesem Grund wurde für die SDS-PAGE von Proteoliposomen bzw. Liposomen eine Methanol/Chloroform Fällung durchgeführt [95]. Äquivalente Mengen des ungefällten Pxa1p-Pxa2p, das für die Rekonstitution eingesetzt wurde, und der gefällten Proteoliposomen wurden auf ein 12% SDS-Gel geladen und mittels Coomassie-Blau Färbung visualisiert. Ein zweites Gel wurde geblottet und eine Immunodetektion mit α FLAG (M2)-AK durchgeführt.

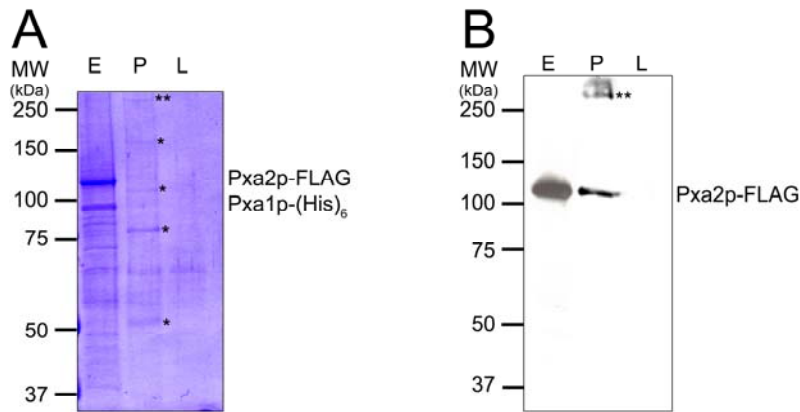


Abb. 42: Analytik von Proteoliposomen mittels SDS-PAGE und Immunodetektion. (A) SDS-PAGE mit Coomassie-Blau Färbung und (B) Immunodetektion von Pxa2p-FLAG mit α FLAG (M2)-AK von Proteoliposomen und Liposomen nach Methanol/Chloroform Fällung. E: für die Rekonstitution eingesetztes Pxa1p-Pxa2p nicht gefällt, P: Proteoliposomen, L: Liposomen.

In Abb. 42 wurden äquivalente Volumina des eingesetzten Proteins aufgetragen, d.h. in der Spur E der für die Rekonstitution eingesetzten Proteinprobe und in der Spur P den Proteoliposomen sollte sich unter der Annahme, dass 100% des Proteins in Proteoliposomen eingebaut wurde dieselbe Proteinkonzentration finden. Dies ist nicht der Fall. Es sind im Gegensatz zu den Liposomen (L) Proteinbanden zu sehen, die Absolutmenge beträgt nur ca. 50% des eingesetzten Proteins, vor allem aber ist die Molekulargewichtsverteilung der Proteine aus den Proteoliposomen eine andere. Keine der signifikanten Banden, die mit einem Stern (*) markiert sind, waren in der Ausgangsprobe detektierbar und Pxa1p und Pxa2p waren in der Coomassie Färbung nicht mehr erkennbar. Im α FLAG (M2)-AK Immunoblot in Abb. 42 (B) ist Pxa2p-FLAG dennoch detektierbar und zusätzlich wird die Bande >250 kDa (**) vom Antikörper erkannt, was beweist, dass Pxa1p-Pxa2p in die Proteoliposomen eingebaut wurde. Die anderen Banden (*) wurden vom Antikörper nicht erkannt. Die Aggregations- und Zerfallreaktionen von Pxa1p und Pxa2p könnten während der Rekonstitution aufgetreten, oder Artefakte der Fällung sein. Ähnliche Effekte wurden bereits für andere ABC-Transporter beschrieben [23], wodurch deutlich wird, dass ABC-Transporter mit ihren ausgedehnten hydrophoben Sequenzbereichen besondere Probleme bei der Analytik verursachen können.

4.3.6 SL-Oleoyl-CoA Markierung von Proteoliposomen

Die symmetrisch markierten proteinfreien LUVs in Abschnitt 4.3.4 wurden durch Zugabe der Fettsäureanaloge zur Ei-PC Lösung vor der Bildung der Vesikel hergestellt. Die Bildung unilamellarer Vesikel aus der wässrigen Lipidlösung wurde durch Gefrier/Tau Zyklen und durch das Extrudieren der Vesikelsuspension durch eine Membran mit einer Porengröße von 100 nm bewerkstelligt, dabei wurden keine Detergenzien benötigt. Bei der Proteoliposomenherstellung wie unter 3.6.12 beschrieben, wurden detergenssolubilisierter Proteine zu gemischten Detergens/Lipid Micellen gegeben. Dabei entstehen gemischte Micellen aus Detergens, Lipid und Protein, die sich beim Entzug des Detergens in unilamellare Proteoliposomen umformen. Das Detergens wird dabei durch Styrol-Beads (BioBeads) entzogen. Da diese hydrophoben Styrol-Beads neben Detergenzien jedoch auch Fettsäuren binden, ist eine symmetrische Markierung der Proteoliposomen mit SL-Oleoyl-CoA nicht möglich und die Sonden wurden nachträglich zugegeben, wodurch eine unsymmetrische Markierung der äußeren Lipidschicht

erzeugt wurde. Bei Zugabe von BSA und Ascorbinsäure zu diesen Vesikeln ist ein geschützter Pool im Innern nur dann zu erwarten, wenn SL-Oleoyl-CoA Moleküle zur inneren Schicht gelangt sind.

Zur Markierung der Proteoliposomen wurde SL-Oleoyl-CoA aus einer Pufferlösung in einer Konzentration zu den Vesikeln gegeben, bei der ein möglichst vollständiger Einbau zu verzeichnen war, was anhand der Spektriform wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben erkennbar ist. Die ESR-Spektren in Abb. 43 zeigen Proteoliposomen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen SL-Oleoyl-CoA markiert wurden. Wie aus den Spektren erkennbar ist beginnt bei Proteoliposomen bereits bei einer SL-Oleoyl-CoA Konzentration von 0,4 mol% eine Zunahme der freien Komponente, was durch den Anstieg des Hochfeldpeaks (Pfeil) sichtbar wird. Diese Konzentration war bei den Proteoliposomen deutlich niedriger als bei den symmetrisch markierten proteinfreien (detergensfreien) Vesikeln in Abschnitt 4.3.4. Dort konnten 2 – 4 mol% vollständig eingebaut werden. Die Ei-PC Konzentration wurde nicht bestimmt, sondern entsprechend der eingesetzten Menge kalkuliert. Dabei handelt es sich nur um eine Abschätzung, da bei der Rekonstitution geringe Mengen Ei-PC verloren gehen.

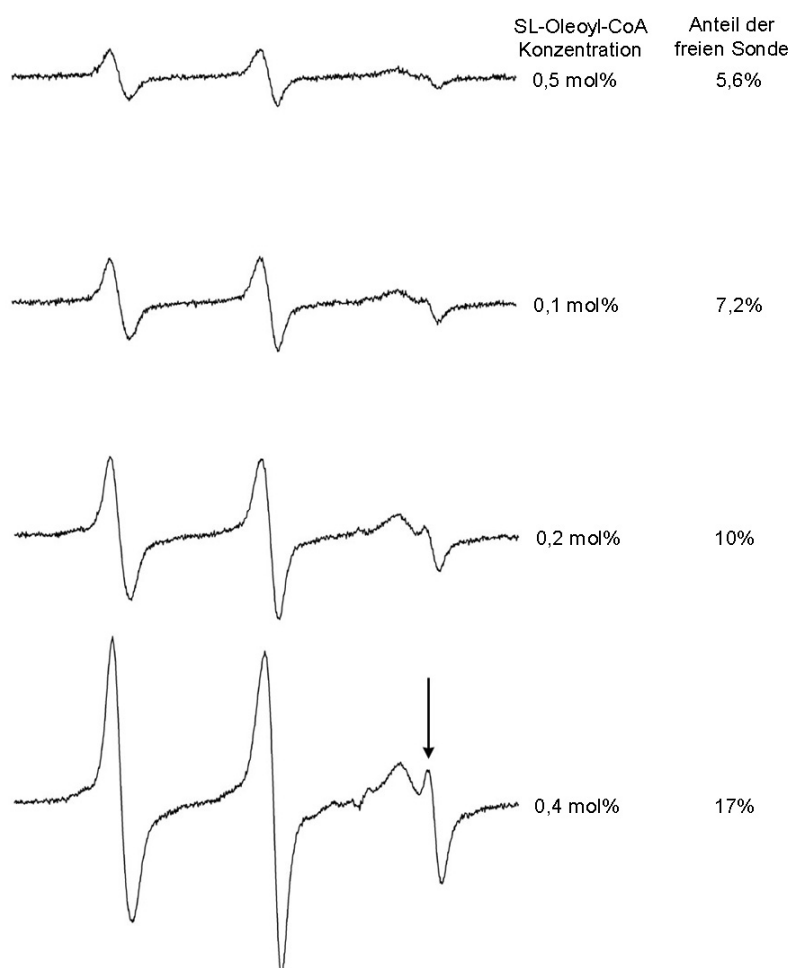


Abb. 43: ESR-Spektren von SL-Oleoyl-CoA markierten Proteoliposomen aus Ei-PC mit unterschiedlichen SL-Oleoyl-CoA Konzentrationen. Die freie Komponente des Hochfeldpeaks (Pfeil) ist ein Hinweis auf freie Sonde, die nicht in die Phospholipidmembran eingebaut wurde. Zur Quantifizierung des freien Anteils wurde ein Spektrum von freier Sonde in Puffer mittels der WIN-EPR Software (Bruker) von den gezeigten Spektren subtrahiert.

Für die nachfolgenden Transportuntersuchungen wurden Proteoliposomen mit ~0,4 mol% SL-Oleoyl-CoA markiert und mit 1,25 mM ATP und 6,25 mM MgCl₂ versetzt und >10 min bei RT inkubiert. Danach wurde ein initiales ESR-Spektrum aufgenommen, BSA und Ascorbinsäure zugegeben und schnellstmöglich weitere Spektren gemessen. Zusätzlich wurden Vergleichsproben mit ATP jedoch ohne MgCl₂ und proteinfreie Liposomen analysiert. Bei der unsymmetrischen Markierung von außen entsteht ein geschützter Pool im Innern nur, wenn das SL-Oleoyl-CoA passiv oder aktiv flipt.

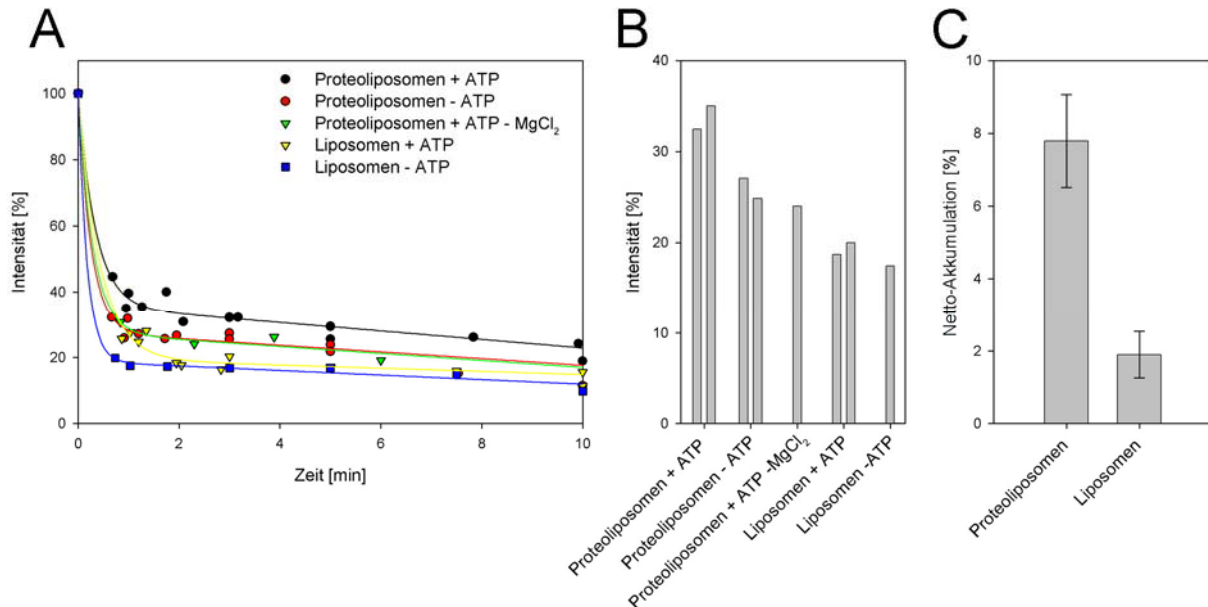


Abb. 44: Exemplarische Transportmessungen von SL-Oleoyl-CoA in Proteoliposomen und Liposomen. (A) BSA/Ascorbinsäure Reduktionskinetiken. Normierte Intensitäten der ESR-Tieffeldpeaks als Funktionen der Zeit bei Ascorbinsäure Reduktion des Spinlabels. Doppelbestimmung von Proteoliposomen mit ATP (schwarz), Proteoliposomen ohne ATP (rot) und Liposomen mit ATP (gelb), Einzelbestimmungen von Proteoliposomen mit ATP aber ohne MgCl₂ (grün) und Liposomen ohne ATP (blau). (B) Intensitäten der Einzelmessungen aus (A) nach 2 min. (C) Netto-Akkumulation von SL-Oleoyl-CoA von Proteoliposomen und Liposomen +/- ATP, d.h. Intensitätsdifferenz nach Inkubation +/- ATP.

Die Ascorbinsäure Reduktionskinetiken in Abb. 44 Teil (A) zeigen unterschiedliche Signalreduktionen für Proteoliposomen, die +/- ATP bzw. MgCl₂ inkubiert wurden, und Unterschiede zwischen Proteoliposomen und proteinfreien Liposomen. Die Signalintensitäten der Reduktionskinetiken wurden nach zwei Minuten aus der Grafik abgetragen, d.h. zum Zeitpunkt, an dem die schnelle Signalreduktion abgeschlossen war. Die Signalintensitäten der Einzelmessungen nach zwei Minuten sind in Abb. 44 Teil (B) zu sehen. In Abb. 44 Teil (C) ist die Netto-Akkumulation aufgetragen, d.h. die gemittelte Signalintensität ohne ATP bzw. MgCl₂ wurde von den Werten mit ATP und MgCl₂ subtrahiert. Die gemessene Netto-Akkumulation für Proteoliposomen betrug $7,8 \pm 1,3\%$, für Liposomen war kein signifikanter Unterschied bei Inkubation +/- ATP erkennbar.

Zur Absicherung der Ergebnisse und mit dem Ziel, eine höhere Nettoakkumulation zu erreichen, wurden die Rekonstitutionsexperimente von Pxa1p-Pxa2p und die Transportmessungen verschiedene Male wiederholt. Die Experimente wurden sowohl mit dem C-terminal epitopmarkierten Konstrukten als auch mit den N-terminal markierten Konstrukten durchgeführt. Abb. 45 zeigt zwei von vier verschiedenen Wiederholungsexperimenten, die mit den C-terminal markierten Fusionsproteinen durchgeführt wurden. Mit dem N-terminal epitopmarkierten Pxa1p-Pxa2p war es nicht gelungen, Transportaktivität von SL-Oleoyl-CoA nachzuweisen. Ob dies mit einer

schwierigeren Rekonstitution zu tun hatte, eine Frage der eingesetzten Proteinkonzentration war oder ob andere Gründe, wie z.B. Instabilität des Substrates mit zunehmender Lagerdauer, eine Rolle spielten, konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr geklärt werden.

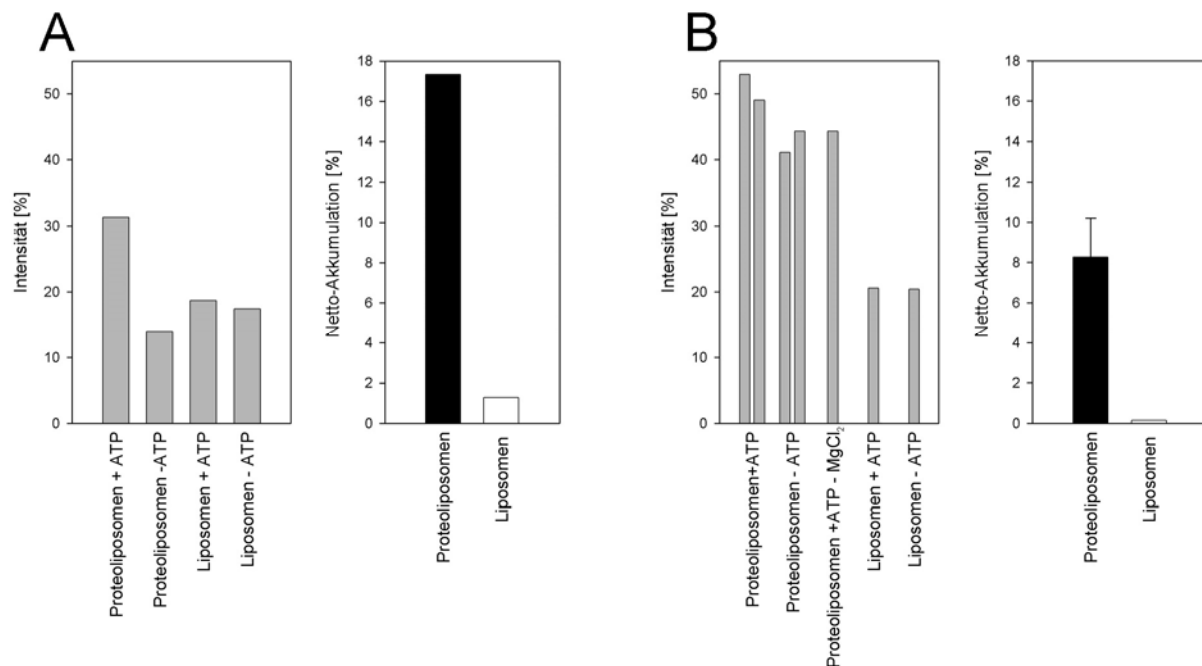


Abb. 45: Transportmessungen von SL-Oleoyl-CoA in zwei verschiedenen Experimenten (A) und (B). Die Proteoliposomen und Liposomen wurden unsymmetrisch mit SL-Oleoyl-CoA markiert und +/-ATP inkubiert. Jeweils links: Normierte Signalintensitäten, die Werte wurden 2 min nach BSA/Ascorbinsäure Zugabe aus den Reduktionskinetiken ermittelt. Rechts: Netto-Akkumulation von SL-Oleoyl-CoA. Die Netto Akkumulation bei Proteoliposomen ist in A = 17,3% und in B = 10,2%. Die Netto-Akkumulationen der Liposomen-Kontrollen liegen bei 1,3% und 0,2%.

In Abb. 45 sind zwei Experimente zum Transport von SL-Oleoyl-CoA in Proteoliposomen mit rekonstituiertem Pxa1p-Pxa2p abgebildet. Es sind jeweils die normierten Signale zwei Minuten nach BSA/Ascorbinsäure Reduktion und die entsprechenden Netto-Akkumulationen aufgetragen. Beide Experimente zeigen unterschiedliche Hintergrundintensitäten der Proteoliposomen. Während bei Teil (A) die Proteoliposomen ohne ATP ähnliche Signalintensitäten aufweisen wie Liposomen, ist die Hintergrundintensität in Teil (B) viel größer, was auf unterschiedliche Qualitäten der Vesikelpräparation schließen lässt. Trotzdem konnte in der Mehrzahl der Experimente eine Netto Akkumulation von SL-Oleoyl-CoA, unter Bedingungen, bei denen ein aktiver Transport erwartet wird (mit ATP und MgCl₂), gemessen werden. Die Ergebnisse zwischen den Experimenten variierten. In Abb. 45 Teil (A) beträgt die Netto-Akkumulation 17,3% und bei (B) 10,2%. Die Netto-Akkumulation konnte möglicherweise wegen einer sterischen Hinderung, verursacht durch die große Coenzym A Kopfgruppe oder der geringen Rekonstitutionseffizienz, nicht über 17,3% hinaus gesteigert werden.

Zusammenfassend lässt sich aus den Transportmessungen schließen, dass C-terminal epitopmarkiertes Pxa1p-Pxa2p *in vitro* in der Lage ist, SL-Oleoyl-CoA unter Verbrauch von ATP zu transportieren und dass dazu MgCl₂ notwendig ist, jedoch keine weiteren Hilfsproteine oder andere Moleküle. Dies unterstützt die molekularbiologischen und biochemischen Untersuchungen, die darauf hinwiesen, dass Pxa1p-Pxa2p auch *in vivo* für den Transport langkettiger Coenzym A aktivierter Fettsäuren verantwortlich ist.

5 Diskussion

Der peroxisomale ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p wurde auf Grund von genetischen und biochemischen Untersuchungen als ATP abhängiger Transporter von Coenzym A aktivierten langkettigen Fettsäuren in die Peroxisomen postuliert [78, 79]. Der direkte Beweis für die Theorie und die mögliche Beteiligung weiterer Proteine bzw. Cofaktoren wurde bisher nicht geführt. In dieser Arbeit wurden erstmals epitopmarkierte Pxa1p und Pxa2p Fusionsproteine exprimiert und in aktiver Form als Dimer aufgereinigt. Dieses Pxa1p-Pxa2p Heterodimer zeigte eine basale ATPase Aktivität, die durch Zugabe verschiedener Substrate gesteigert werden konnte. Außerdem konnten die aufgereinigten ABC-Transporter erfolgreich in Proteoliposomen rekonstituiert werden und in diesem Modellsystem der aktive Transport des neu synthetisierten SL-Oleoyle-CoA unter Zugabe von ATP nachgewiesen werden.

5.1 Warum sind peroxisomale Membranen kein geeignetes Ausgangsmaterial für Acyl-CoA stimulierte ATPase Aktivitätsmessungen und Transportmessungen?

Da Peroxisomen von *S. cerevisiae* anders als andere Organellen zu instabil sind, um sie in intakter Form aufzureinigen, war es nicht möglich, die Substrattranslokation direkt an peroxisomalen Membranen zu messen [19, 86]. Der ursprüngliche experimentelle Ansatz war daher, eine subzelluläre Fraktionierung zur Aufreinigung peroxisomaler Membranen des Wildtyp- und des *pxa1Δ* bzw. *pxa2Δ* Mutantenstamms durchzuführen. Die Membranproteine sollten solubilisiert und in Proteoliposomen rekonstituiert werden, um dann für Translokationsmessungen mit langkettigen Acyl-CoAs eingesetzt zu werden. Der experimentelle Ansatz wurde aufgegeben, weil die Kontrollsubstrate ^{14}C -Lauroyl-CoA und ^{14}C -Oleoyle-CoA modifiziert wurden (siehe 4.1.1). Aus den Coenzym A aktivierten Fettsäuren entstand die freie Fettsäure und einige nicht näher definierte Produkte. Kontrollexperimente mit der Thioesterase-Mutante (BJ1991*tes1Δ*) und der Acyl-CoA-Oxidase-Mutante (BJ1991*fox1Δ*) zeigten für die β -Oxidationsdefiziente *fox1Δ*-Mutante einen leicht verminderten Substratabbau, während die *tes1Δ*-Mutante keinen Unterschied zum Wildtyp aufwies (Daten nicht gezeigt), woraus geschlossen werden kann, dass es sich bei dem vorliegenden Abbau, zumindest teilweise, um β -Oxidationsreaktionen handelt. In der Tat gibt es Hinweise, dass die Acyl-CoA Oxidase in reifen Peroxisomen teilweise membrangebunden vorliegt [9]. Weitere Abbaureaktionen sind möglicherweise auf die Pcd1p Nudix Hydrolase zurückzuführen, eine peroxisomale Pyrophosphatase, die von Coenzym A und CoA Derivaten 3'-Phosphoadenosin 5'-monophosphat (3',5'-ADP) abspaltet [11]. Diese Abbaureaktion würde das gefundene Abbaumuster etwas besser erklären, da bei der β -Oxidation nach dem ersten Zyklus das ^{14}C -Atom in C_1 -Position abgespalten ist und der Fettsäurerest damit nicht mehr autoradiographisch detektiert werden kann, im Gegensatz zur Nudix Hydrolase Reaktion, bei der die Fettsäure das $^{14}\text{C}_1$ -Atom behält. Unabhängig von der exakten Reaktion kann jedoch festgestellt werden, dass die Substratstabilität nicht ausreichend war für weitere Untersuchungen, da freie Fettsäuren völlig andere physikalische Eigenschaften haben als Acyl-CoA Ester. So sind freie Öl- und Stearinsäure zu spontanem Flip-flop in der Lage, während die entsprechenden CoA Ester keine schnelle Transversalbewegung ausführen, wie gezeigt wurde (siehe Abb. 41).

Weitere Gründe, warum peroxisomale Membranen kein geeignetes Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen darstellen, sind die geringe Ausbeute an sauberen, angereicherten peroxisomalen Membranen, und das ge-

ringe native Expressionslevel der peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p [54]. So konnte bei peroxisomalen Membranen im Gegensatz zu mitochondrialen Membranen keine ATPase Aktivität gemessen werden.

5.2 Epitopmarkierung, Überexpression und Aufreinigung von Pxa1p-Pxa2p

Da sich peroxisomale Membranen nicht als geeignetes Ausgangsmaterial erwiesen hatten, wurden epitopmarkierte Proteinvarianten kloniert und homolog überexprimiert.

Peroxisomale Proteine werden im Zytosol translatiert und posttranslational prozessiert. Reife zytosolische Vorstufen werden meist ohne weitere Modifikationen in die Peroxisomen importiert. Anders als peroxisomale Matrixproteine, die eine C-terminale Signalsequenz (meist SKL) besitzen, haben peroxisomale Membranproteine eine interne Signalsequenz (Pex19p Bindungssequenz) [69]. Bei Pxa1 liegt diese Signalsequenz zwischen den Aminosäuren 71 und 168 [87]. Da die Signalsequenz bei Pxa1p und Pxa2p intern lokalisiert ist und sowohl die N- als auch die C-Termini auf der zytosolischen Seite der peroxisomalen Membran liegen, standen prinzipiell beide Enden für die Epitopmarkierung zur Verfügung. In der Literatur gibt es Beispiele für die C-terminale Epitopmarkierung [24, 30, 37] und für die N-terminale Markierung [64] von ABC-Halbtransportern unter Erhaltung der Aktivität, aber auch Beispiele dafür, dass nur die Markierung an einem Ende funktional ist [72]. Für Pxa2p lagen bereits experimentelle Daten für die Funktionalität der N- und der C-terminal markierten Mutante vor. Hettema *et al.* zeigten die Aktivität von Pxa2p mit N-terminalem HA-Epitop [33] und Shani *et al.* mit C-terminalem HA-Epitop [77]. Für Pxa1p lagen im Vorfeld keine Daten vor, ebenso wenig wie für Pxa1p-Pxa2p mit erhöhter Expressionsrate.

Die initiale Expressionsstrategie für Pxa1p-Pxa2p war eine plasmidkodierte Expression mit ölsäureinduzierbarem *FOX3*-Promotor und C-terminalen Epitopen zum Nachweis und zur Aufreinigung. Der *FOX3*-Promotor der 3-oxoacyl CoA Thiolase enthält das typische „oleate response element“ (ORE) für die ölsäureinduzierten Transkriptionsfaktoren Pip2p-Oaf1p. Die Sequenz des *FOX3*-Promotors und des ORE sind in Abb. 46 abgebildet. Die Transkriptionsfaktoren Pip2p-Oaf1p werden durch Ölsäure aktiviert und durch Glukose reprimiert, wobei die Glukose Repression dominant ist. *FOX3* ist einer der stärksten ölsäureinduzierbaren Promotoren [29].

```
CGTCAACATGAGGAGGGTAATGATGTGGTAGCGCCGTGTAAGGCGCTATCAAAGGGAACGGGGATAATAGTATTAACACCGCAG
CGGNNNTANNNNNNNNNNNNCCG
CTTTTTTTTCTTCTCCCTCTATTGGTTTCAAATTTATTGGAGTTTTACTAGAAAGAAAGAGATATAAATAGGGTATACTTTTC
ATCTCAGTTCTATTGAAATCGAATGGTTATTTCTTGTGGCTCTGAGTACAGAGTGAAATATAACACTACATAAAAGCAACTAGTG
```

Abb. 46: *FOX3*-Promotorsequenz und „oleate response element“ (ORE) in rot. Das minimale ORE ist definiert als CCGN₃TN^A/_RN₈₋₁₂CCG [29] (N: beliebiges Nukleotid; N^A/_R: Adenosin oder Guanosin).

Um Nachweis- und Aufreinigungsmöglichkeiten für beide ABC-Halbtransporter zu schaffen, falls sich das Dimer nicht im Komplex aufreinigen lassen sollten, bzw. für eine Tandemaufreinigung wurden für beide Halbtransporter unterschiedliche Epitope verwendet, das (His)₆-Epitop und das FLAG-Epitop. Die C-terminal markierten Halbtransporter zeigten volle Aktivität und Wildtypeigenschaften beim Wachstumstest auf Ölsäuremedium. Der immunologische Nachweis des (His)₆-Epitops war äußerst schwierig. Es zeigte sich, dass der Nachweis in frischen Proben gelang, während der Nachweis in einmal eingefrorenen Proben kein Signal mehr ergab. Außerdem konnte durch Bindung des Detergenslysats an Nickel-Agarose keine Anreicherung erzielt werden (Daten nicht gezeigt), obwohl andere ABC-Transporter mit C-terminalem His-Epitop erfolgreich aus *S. cerevisiae* aufgereinigt wurden [30, 37]. Ein weiteres Konstrukt mit Strep-Epitop konnte ebenfalls nicht nach-

gewiesen werden, aber der Nachweis und die Aufreinigung mit FLAG-Epitop gelang. Durch Bindung des DDM-Lysats an ANTI-FLAG (M2) Affinity-Gel konnte das Pxa1p-Pxa2p Dimer in einer Reinheit von 65 - 85% aufgereinigt werden, wodurch kein zweiter Aufreinigungsschritt notwendig wurde. Die elektrophoretisch aufgetrennten Banden von Pxa1p und Pxa2p wurden massenspektrometrisch mit ESI-MS analysiert, dabei wurden die Banden verifiziert und es stellte sich eine irreguläre Migration der Proteine in der SDS-PAGE heraus. Das kleinere Pxa2p zeigt eine langsamere Migration in der SDS-PAGE als das größere Pxa1p. Das massenspektrometrisch ermittelte Molekulargewicht stimmt exakt mit dem theoretisch ermittelten Gewicht überein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es keine posttranslationalen Modifikationen bei Pxa1p und Pxa2p gibt.

Weshalb die Aufreinigung mit FLAG-Epitop erfolgreich war, mit His-Epitop jedoch nicht, darüber kann nur spekuliert werden. An der sterischen Zugänglichkeit der Epitope kann es kaum liegen, da sich diese am selben Lokus befinden. Die FLAG-Epitopsequenz existiert in *S. cerevisiae* nicht, beim immunologischen Nachweis mit α FLAG (M2)-AK kommt es zu keinerlei Kreuzreaktion mit nativ exprimierten Proteinen und es ist außer den FLAG-Fusionsproteinen kein Signal erkennbar. Dies führt ebenfalls dazu, dass es bei der Aufreinigung mit ANTI-FLAG (M2) Affinity-Gel zu keiner Konkurrenz um den Antikörper kommt. Dies steht im Kontrast zu Histidin-Clustern, die bei *S. cerevisiae* relativ häufig vorkommen. Bei der Aufreinigung an Ni-NTA Agarose fanden sich viele kontaminierende Proteine, es konnte aber weder (His)₆-Pxa1p noch Pxa2p-(His)₁₀ angereichert werden, zumindest nicht in voller Länge, da keine Proteine mit der entsprechenden Größe aufgereinigt wurden. Bei einer systematischen immunologischen Untersuchung der Eluate von der Ni-NTA Agarose mit His-AK fand Michael Schneider massiven Abbau, während sich Pxa1p-Pxa2p bei der Elution vom ANTI-FLAG (M2) Affinity-Gel sehr stabil verhält. Es sind nahezu keine Zerfalls- und Abbauprodukte erkennbar, außer man verzichtet bei der Aufreinigung auf Glycerin. Glycerin scheint das Dimer zu stabilisieren und Aggregation zu verhindern, ohne Glycerin waren auch Zerfallsprodukte erkennbar. Zusammengefasst könnte der Grund für die fehlgeschlagene Aufreinigung an Ni-NTA Agarose an einer geringeren Stabilität des His-Epitops und an einer größeren Konkurrenz um die Bindungsstellen liegen.

Zur Untersuchung der Detergenssolubilisierbarkeit von Pxa1p-Pxa2p wurden von Michael Schneider verschiedene übliche Detergenzien systematisch untersucht. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit Digitonin und DDM erzielt. Dies ist besonders interessant, da Digitonin bei humanen Zellen nur die Plasmamembran zerstören kann, während Peroxisomen intakt bleiben [8]. Für die Solubilisierung wurde DDM verwendet, da es bereits bei anderen ABC-Transportern erfolgreich zur Aufreinigung unter Erhalt der Aktivität eingesetzt wurde [12, 23, 30].

Die Ausbeute an aufgereinigtem Pxa1p-Pxa2p bei ölsäureinduzierter Expression von Plasmiden war mit 15 - 20 µg/g Feuchtgewicht vergleichsweise gering (2,4 – 2,8 g Feuchtgewicht / l Kulturvolumen). Bei der Expression und Aufreinigung des humanen ABC-Transporters ABCB1 (P-gp) aus *S. cerevisiae* konnte eine Ausbeute von 120 µg/g Feuchtgewicht erzielt werden [24]. Bei der Aufreinigung von Ant1p, einem integralen peroxisomalen Membranprotein aus *S. cerevisiae* mit einem deutlich höheren nativen Expressionslevel als Pxa1p und Pxa2p [54] konnten jedoch auch nur 25 µg/l Kulturvolumen aufgereinigt werden [56]. Diese Ausbeute ist nicht höher, als die in dieser Arbeit erzielte Ausbeute für Pxa1p-Pxa2p.

Zur Steigerung der Ausbeute wurde eine zweite Expressionsstrategie für Pxa1p-Pxa2p mit N-terminaler Epitopmarkierung und dem regulierbaren *Gall*-Promotor gewählt. Der starke *Gall*-Promotor ist ebenfalls Glukose reprimierbar, und die Transkription kann durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glukose zu Galaktose

gezielt angeschaltet werden. Pxa1p und Pxa2p im Wildtypstamm BY4742 wurden durch homologe Rekombination mit einer *Gall*-Kassette und den Epitopen (FLAG bzw. (His)₁₀) genomisch markiert [50]. Dadurch konnte bei der Kultivierung auf Minimalmedium verzichtet werden. Es existierte jedoch kein Aktivitätstest auf Ölsäuremedium, da bei Anwesenheit von Zucker dieser bevorzugt abgebaut wird, und der Abbau der Ölsäure unterbleibt. Lokalisationsstudien von Michael Schneider (Ruhr Universität Bochum) wiesen auf eine korrekte Lokalisation der ABC-Halbtransporter in den Peroxisomen hin (Daten nicht gezeigt). Pxa2p mit N-terminalem (His)₁₀-Epitop konnte ebenfalls nicht durch Bindung an Nickel-Agarose aufgereinigt werden, obwohl das His-Epitop gegenüber dem C-terminalen Konstrukt von 6 auf 10 Spezies verlängert wurde. Die Affinitätsaufreinigung an ANTI-FLAG (M2) Affinity-Gel funktionierte aber ebenso gut wie beim C-terminalen Konstrukt und das Dimer konnte ebenfalls im Komplex aufgereinigt werden. Die Bildung des stabilen Dimers ist ein starker Hinweis auf die korrekte Faltung und die Aktivität der ABC-Transporter. Die Ausbeute an Pxa1p-Pxa2p konnte auf 30–35 µg/g Zellfeuchtgewicht gesteigert werden und die Zellausbeute auf 6–7 g Zellfeuchtgewicht/l Kulturvolumen, so dass die Pxa1p-Pxa2p Netto Ausbeute auf 100–120 µg/l gesteigert werden konnte (C-terminal 30–40 µg/l).

Bei der Klonierung der Expressionssysteme wurden das His- und das FLAG-Epitop zwischen den ABC-Halbtransportern ausgetauscht. Bei der Affinitätsaufreinigung an ANTI-FLAG (M2) Affinity-Gel war jeweils das FLAG-Fusionsprotein stärker repräsentiert (siehe Abb. 26). Die höhere Anreicherung könnte durch Bindung der monomeren Vorstufe der Halbtransporter, Zerfall des Dimers oder durch partielle Formation von Homodimeren begründet sein. Die Bildung von Homodimeren wird für die homologen humanen peroxisomalen ABC-Halbtransporter ABCD1–4 diskutiert [85].

Bei der Analytik des Aufreinigungsverlaufs (siehe 4.2.3) wurde deutlich, dass ein großer Anteil von Pxa1p-Pxa2p nicht DDM solubilisierbar war. Dies konnte nicht durch eine längere Solubilisierungsdauer gesteigert werden. Eine Erhöhung der DDM Konzentration wurde nicht getestet, jedoch die Verwendung von Triton X-100 anstelle von DDM, was zu vergleichbaren Ergebnissen führte (Daten nicht gezeigt). Da bei der Konzentrierung von Pxa1p-Pxa2p mit Centrikon Zentrifugationskonzentratoren starke Aggregationsneigung zu erkennen war, liegt die Annahme nahe, dass es sich bei dem detergensunlöslichen Rückstand um inaktive Aggregate handelt, die durch die Überexpression entstanden sind.

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass Pxa1p und Pxa2p sowohl als N-terminal- als auch als C-terminale epitopmarkierte Fusionsproteine als Heterodimere in aktiver Form aufgereinigt werden konnten. Die Aufreinigung gelang in einem Schritt bis zu einer Reinheit von 65–85%. Die Solubilisierbarkeit mit DDM war für beide Expressionssysteme nicht vollständig, wobei sowohl die Ausbeute als auch der unlösliche Anteil beim stärkeren *Gall*-Promotor Expressionssystem höher war (siehe Abb. 25). Die Pxa1p-Pxa2p Ausbeute lag bei den C-terminalen Fusionsproteinen bei 15–20 µg/g und bei den N-terminalen Fusionsproteinen bei 30–35 µg/g Feuchtgewicht. Diese Ausbeute ist niedriger als für andere ABC-Transporter berichtet wurde, jedoch höher als für Ant1p, obwohl das native Expressionslevel von Ant1p deutlich höher ist als von Pxa1p-Pxa2p, weshalb sich spekulieren lässt, ob die relativ geringe Anzahl und Größe von Peroxisomen das limitierende Element für die Aufreinigung von peroxisomalen Membranproteinen bildet.

5.3 Charakterisierung der Nukleotidbindung von Pxa1p-Pxa2p

Zur Charakterisierung der ATP Bindung wurden UV-Licht induzierte Markierungsexperimente mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP durchgeführt. Viele ABC-Transporter zeichnen sich durch eine magnesiumabhängige azido-ATP Bindung aus. Dies trifft für die peroxisomalen ABC-Transporter nicht zu wie auch Tanaka *et al.* gezeigt haben [84]. Unabhängig davon bleibt auch für peroxisomale ABC-Transporter die ATP Hydrolyse Mg^{2+} abhängig wie in den ATPase Messungen gezeigt wurde.

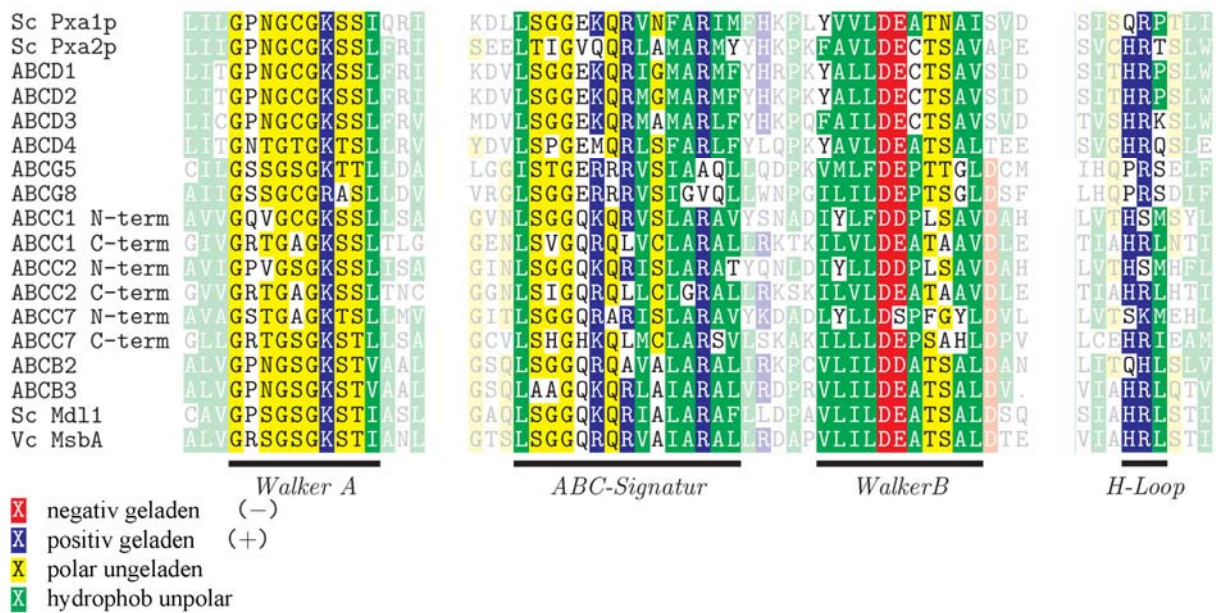
Die Fixierung von ADP in den nukleotidbindenden Domänen von ABC-Transportern durch Vanadat wird allgemein als charakteristisch beschrieben [1], es wurde bei vielen eukaryotischen und prokaryotischen ABC-Transportern wie ABCB1 (P-gp), ABCC1 (MRP1), Mdr1, MsbA, BtuCD, PglK usw. beobachtet. Vanadat ist ein Analogon des γ -Phosphats von ATP. Es ist bei vielen ABC-Transportern in der Lage einen stabilen Komplex mit Mg^{2+} und ADP zu bilden, der ATP im Übergangszustand der Hydrolyse nachahmt. Für ABCB1 (P-gp) wurde zuerst gezeigt, dass das Trapping nach der ATP Hydrolyse stattfindet, wenn Vanadat das freigesetzte Phosphat ersetzt [16]. Im Gegensatz dazu werden die peroxisomalen ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p durch Vanadat nicht getrappt. Dies scheint eine generelle Eigenschaft der peroxisomalen ABC-Transporter zu sein, da auch für die humanen ABC-Transporter gezeigt wurde, dass Vanadat keinen trappenden Einfluss hatte [84]. Die peroxisomalen ABC-Transporter stellen keine völlige Ausnahme dar, da ähnliche Ergebnisse für ABCG5/G8 publiziert wurden [93]. Neben Vanadat, werden häufig Metallfluoride wie Berylliumfluorid und Aluminiumfluorid zum ADP Trapping von ABC-Transportern eingesetzt [70]. Beide epitopmarkierte Varianten von Pxa1p-Pxa2p konnten mit Metallfluoriden getrappt werden, was einen sehr starken Hinweis darauf liefert, dass beide Varianten in der Lage sind ATP zu hydrolysieren. Während Aluminiumfluorid bei beiden epitopmarkierten Varianten von Pxa1p-Pxa2p ein Trapping verursachte, hatte Berylliumfluorid nur bei den C-terminal markierten Transportern einen Einfluss. Das unterschiedliche Verhalten kann nicht erklärt werden und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Das Nukleotidtrapping wurde in beiden Halbtransportern beobachtet, woraus geschlossen werden kann, dass beide nukleotidbindenden Domänen an der ATP Hydrolyse beteiligt sind. Für Pxa1p konnte dabei eine stärkere relative Signalzunahme verzeichnet werden. Einschränkend muss erwähnt werden, dass es theoretisch noch einen weiteren möglichen Mechanismus für das Trapping gibt: ADP aus anderen Quellen könnte in den NBDs gebunden und durch Metallfluoride getrappt werden. Da es sich bei den Proteinpräparationen jedoch um isolierte ABC-Transporter in hoher Reinheit handelt und azido-ATP im Überschuss vorhanden ist, d.h. durch ADP aus den Bindungsstellen verdrängt werden müsste, kann diese Variante nahezu ausgeschlossen werden.

Die meisten ABC-Transporter bestehen aus zwei Transmembrandomänen und zwei nukleotidbindenden Domänen, die in einer Reihe angeordnet sind. Die beiden Hälften können identisch bei Homodimeren oder unterschiedlich bei Heterodimeren oder Volltransportern sein. Der Mechanismus, der den Substrattransport mit der ATP Hydrolyse verbindet, ist nicht vollständig verstanden und aufgeklärt. Vier hochkonservierte Motive in der nukleotidbindenden Domäne (NBD) von ABC-Transportern spielen eine wichtige Rolle bei der ATP-Bindung und Hydrolyse: das Walker A und das Walker B Motiv, das H-Loop (switch-Motiv) sowie die ABC-Signatur. Im sogenannten Sandwichmodell der ATP Bindung wird die Nukleotidbindetasche von der Walker A Domäne, der Walker B Domäne und dem H-Loop des einen Transporters und der ABC-Signatur des anderen Transporters gebildet [61], dabei sitzt der Adeninring von ATP in einer Tasche die unter Beteiligung der Walker A Domäne gebildet wird [2], weshalb beim „Photo-cross-linking“ von 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP das ATP Analogon bei der Wal-

ker A Domäne verbleibt. In Abb. 47 wird ein Sequenzvergleich der wichtigen NBD-Motive der peroxisomalen ABC-Transporter aus Mensch und Hefe mit unsymmetrisch bindenden ABC-Transportern und gut charakterisierten ABC-Transportern gezeigt.

Bei Homodimeren (Sc Mdl1 und Vc MsbA) wird davon ausgegangen, dass keine der Nukleotidbindenden Domänen bevorzugt ist, und dass beide ATP binden und hydrolysieren. Für das Pxa1p-Pxa2p Heterodimer wurde in dieser Arbeit eine unsymmetrische Markierung beobachtet. Die 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung an Pxa2p ist deutlich stärker als an Pxa1p, bei sehr ähnlichen Dissoziationskonstanten. Ähnliches wurde bereits bei anderen ABC-Transportern beobachtet, wie Abb. 47 zu entnehmen ist. Die beobachtete unsymmetrische Bindung von Pxa1p und Pxa2p mit 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP lässt sich sehr gut mit dem Sandwichmodell und den degenerierten Motiven der Pxa1p H-Loop und der Pxa2p ABC-Signatur aus dem Homologievergleich erklären. Da die ATP Bindung von der Walker A und Walker B Domäne sowie dem H-Loop des einen Partners und der ABC-Signatur des anderen Partners stabilisiert wird, erklärt sich die schwächere Bindung dadurch, dass bei der ATP Bindung von Pxa1p zwei degenerierte Motive beteiligt sind. Die homologen peroxisomalen ABC-Transporter der Ratte ABCD1 und ABCD4 haben nur eine degenerierte ABC-Signatur und zeigen bei Heterodimerisierung eine symmetrische ATP Bindung [84].

Bei ABCG5/G8 lässt sich die unsymmetrische ATP Bindung ebenfalls über die konservierten Motive erklären. ABCG5/G8 weisen im Vergleich zu allen anderen gezeigten ABC-Transportern eine reverse Anordnung auf, mit den NBDs am N-Terminus. In ABCG5/G8 sind beide H-Loops degeneriert, in ABCG8 ist das hochkonservierte Lysin in der Walker A Domäne gegen Arginin ausgetauscht und ABCG5 besitzt eine degenerierte ABC-Signatur. Damit sind an der Nukleotidbindung von ABCG8 drei degenerierte Motive beteiligt, wodurch sich die schwächere Nukleotidbindung begründen lässt [97]. Dagegen zeigen die Volltransporter ABCC1 (Mrp1), ABCC2 (Mrp2) und ABCC7 (CFTR) kein klares Bild. Bei allen drei Volltransportern aus der C-Familie bindet die C-terminale NBD stärker. Alle drei ABC-Transporter haben eine degenerierte Walker A Domäne, wobei das nicht homologe Alanin (A), nicht immer mit einer schwächeren Bindung korrespondiert. Betrachtet man nur die ABC-Signatur, die Walker B Domäne und das H-Loop, gelangt man wiederum zu einer Übereinstimmung mit dem Sandwichmodell [25, 39]. Für die humanen Halbtransporter ABCB2 (Tap1) und ABCB3 (Tap2) dagegen lässt sich das Modell nicht anwenden. An der Nukleotidbindung von ABCB2 sind drei degenerierte Motive beteiligt, trotzdem bindet ABCB2 mehr 8-azido- $[\alpha^{32}\text{P}]$ -ATP als ABCB3. ABCB2/B3 besitzt jedoch die Besonderheit, dass es noch einen weiteren Liganden, das Tapasin, bindet. Für ABCB2/B3 ist ebenso, wie bei Pxa1p-Pxa2p, die unsymmetrische Bindung beider Halbtransporter mit sehr ähnlichen Dissoziationskonstanten verbunden [46, 61].



	Walker A	ABC-Signatur	Walker B	H-Loop	Bindung	Dissoziationskonstante	Literatur
Sc Pxa1p				degeneriert	--	0,24 µM	diese Arbeit
Sc Pxa2p		degeneriert			++	0,30 µM	
ABCD1					++	?	[84]
ABCD2					?	?	
ABCD3					?	?	
ABCD4		degeneriert			++	?	
ABCG5		degeneriert		degeneriert	++	57 µM	[97]
ABCG8	degeneriert			degeneriert	--	174 µM	
ABCC1 N-term			degeneriert		--	?	[39]
ABCC1 C-term	degeneriert	degeneriert			++	?	
ABCC2 N-term			degeneriert		--	?	[25]
ABCC2 C-term	degeneriert	degeneriert			++	?	
ABCC7 N-term	degeneriert		degeneriert	degeneriert	--	?	[25]
ABCC7 C-term		degeneriert			++	?	
ABCB2			degeneriert	degeneriert	++	2,1±0,8 µM	[46, 61]
ABCB3		degeneriert			--	2,7±1,0 µM	
Sc Mdl1					Homodimer	0,26 µM	[37]
Vc MsbA					Homodimer	?	[12]

Abb. 47: Homologievergleich von konservierten Sequenzmotiven der NBD von peroxisomalen ABC-Transportern aus Mensch (ABCD1-4) und Hefe (Pxa1p und Pxa2p), ABC-Transportern mit unsymmetrischen NBDs: ABCG5/8, ABCC1 (Hs Mrp1), ABCC2 (Hs Mrp2), ABCC7 (Hs CFTR) und ABCB2/B3 (Hs Tap1/Tap2) und zwei gut charakterisierten Homodimeren (Sc Mdl1 und Vc MsbA) (ClustalW Alignment mit TEXshade Software bearbeitet [7]). Auswertung des Homologievergleichs, degenerierte Motive sind gekennzeichnet. Bindung (++) markiert die stärker bindende NBD. Bindung (++) homologe Proteine von Hs ABCD1 und ABCD4 der Ratte wurden untersucht, ABCD4 bildete in der Untersuchung Homodimere und Heterodimere mit ABCD1 [84]. Bei den Homodimeren Sc Mdl1 und Vc MsbA existiert keine Asymmetrie.

Durch Vergleich der konservierten Motive lässt sich die unsymmetrische 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung in Pxa1p-Pxa2p erklären. In Abschnitt 4.2.6 wurde gezeigt, dass 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP und unmarkiertes ATP um die ATP-Bindungstasche konkurrieren und dass beide mit hoher Affinität gebunden werden. Die ATP Bindung kann nicht mit der ATP Hydrolyse gleichgesetzt werden, und in vielen Experimenten wurde gezeigt, dass sich die ATP Bindung der beiden Halbtransporter bzw. Untereinheiten gegenseitig beeinflusst [46, 97]. Die degenerierte Seite hat dabei möglicherweise regulative Funktion. So konnte bei Mdr1 gezeigt werden, dass ein „ADP-Trapping“ der konservierten Seite die ATP Bindung der degenerierten NBD erhöht [39]. Ein ähnlicher Effekt könnte bei Pxa1p-Pxa2p existieren, da beim Trapping die Signalunterschiede zwischen den beiden Halbtransportern abnehmen. Die isolierte Expression von Pxa1p oder Pxa2p wurde nicht untersucht. Es ist jedoch kaum wahrscheinlich, dass Pxa1p oder Pxa2p aktive Homodimere bilden kann, da im Funktionalitätstest die *pxa1Δ* und die *pxa2Δ* Mutante dasselbe reduzierte Wachstum zeigten wie die *pxa1Δ pxa2Δ* Doppelmutante (siehe 4.2.1).

5.4 Unterscheidet sich die Aktivität der C-terminal epitopmarkierten Halbtransporter Pxa1p und Pxa2p von den N-terminal markierten Varianten?

Der aufgereinigte ABC-Transporter Pxa1p-Pxa2p konnte sowohl mit C-terminal als auch mit N-terminaler Epitopmarkierung unter Erhaltung der ATPase Aktivität aufgereinigt werden. Die ATPase Aktivität des C-terminal markierten Transporters wurde als $0,087 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (basal) und $0,15 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (substratstimuliert) bestimmt. Die Aktivität des N-terminal markierten Konstruktes wurde als $0,27 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (basal) und $0,49 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ (substratstimuliert) gemessen. Der Faktor zwischen der basalen und der stimulierten Aktivität ist mit 1,7 bzw. 1,8 bei beiden Konstrukten gleich und die gemessene Aktivität ist bei dem N-terminal epitopmarkierten Konstrukt, das in einer größeren Ausbeute aufgereinigt werden kann, um den Faktor $\sim 3,2$ höher. Da die Bestimmung der ATP-Hydrolyserate massiv von der Proteinkonzentrationsbestimmung abhängt, und diese vor allem bei niedrigen Konzentrationen störungsanfällig ist, ist es fraglich, ob die Hydrolyseraten wirklich unterschiedlich sind, oder ob bei der geringeren Ausbeute des C-terminalen Konstruktes kontaminierende Proteine bei der Proteinkonzentrationsbestimmung stärker ins Gewicht fallen und die Hydrolyserate verfälschen. Neben kontaminierenden Proteinen aus der Hefe kann in den Elutionsfraktionen das 3 x FLAG-Peptid die Proteinkonzentrationsbestimmung verfälschen. Es wird dem Elutionspuffer in einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ zugesetzt, der überwiegende Anteil wird aber wahrscheinlich an die Matrix gebunden und taucht im Eluat nicht auf ($M = 2,8 \text{ kDa}$; in SDS-Gelen nicht sichtbar).

Die basale ATPase Aktivität des N-terminal markierten Pxa1p-Pxa2p liegt in derselben Größenordnung wie die anderer ABC-Transporter. Die ATPase Aktivität ist mit $V_{\text{max}} = 0,27 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ etwas niedriger als z.B. von Mdl1 (*S. cerevisiae*; $2,3 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [37], MalK (*S. typhimurium*; $1,3 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [52], BmrA (*B. subtilis*; $1,2 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [63], ABCB1 (P-gp; *H. sapiens*; $0,5 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [80] und ABCC1 (MRP1; *H. sapiens*; $0,46 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [13]. Es gibt aber auch ABC-Transporter mit geringerem ATP Umsatz wie z.B. MsbA (*E. coli*; $0,04\text{-}0,15 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [20], PglK (*C. jejuni*; $0,047 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [1], ABCG5/G8 (*H. sapiens*; $0,015 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [93] und ABCC2 (MRP2; *H. sapiens*; $0,025 \mu\text{mol ATP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [30].

Alle EnzChek Phosphatmessungen wurden mit konstanten ATP, MgCl_2 und Substratkonzentrationen durchgeführt. Die EnzChek ATPase Messungen wurden durch Vergleichsmessungen in einem radioaktiven ATPase Assay validiert. Hier konnte auch eine vollständige Hemmung der Aktivität des C-terminal epitopmarkierten Konstruktes durch Berylliumfluorid nachgewiesen werden. Die EnzChek Messungen zeigten einen linearen Zusammenhang der ATPase Aktivität mit der Proteinmenge im Bereich bis $1,2 \mu\text{g Pxa1p-Pxa2p}$. Die Absorptionswerte bei der kontinuierlichen ATPase Aktivitätsmessung zeigten innerhalb des Messzeitraums von 30 min einen linearen Verlauf ohne ADP Hemmung (Rohdaten nicht gezeigt). Die substratstimulierte ATPase Aktivität des detergessolubilisierten N-terminal markierten Pxa1p-Pxa2p mit $100 \mu\text{M Oleoyl-CoA}$ ist mit $V_{\text{max}} = 0,49 \mu\text{mol ATP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ um den Faktor 1,8 größer als die basale Aktivität. Für andere ABC-Transporter ist eine stimulierbare ATPase Aktivität nur nach Rekonstitution in Proteoliposomen beschrieben. So konnte die ATPase Aktivität von rekonstituiertem ABCC2 (MRP2) unter Zugabe von reduzierten Glutathion als Substrate um den Faktor 3,7 erhöht werden [30] und bei ABCB1 (P-gp) unter Zugabe von Verapamil um den Faktor ~ 12 [44]. Eine ATPase Messung von rekonstituiertem Pxa1p-Pxa2p war bisher nicht erfolgreich, da Proteoliposomen in Reaktionsansätze mit dem EnzChek Phosphat-Assay zu Artefakten führten. Der Farbstoff MESG reagierte sowohl mit proteinfreien Liposomen als auch mit Proteoliposomen und es entstand ein trüber Niederschlag. Die radioaktive Messung der ATPase Aktivität war im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

5.5 Welche Erklärung gibt es für die widersprüchlichen Ergebnisse der stimulierbaren ATPase Messungen?

Substratstimulierte ATPase Messungen werden bei der Suche nach interagierenden Substraten von ABC-Transportern gerne herangezogen, da sie relativ einfach durchzuführen sind. Die meisten der effizient transportierten Substrate stimulieren die ATPase Aktivität. Es wurden jedoch auch Ausnahmen gefunden, wo Substrate bei niedrigen Konzentrationen stimulierten und bei höheren Konzentrationen inhibitorische Wirkung hatten. So zeigt ABCB1 (P-gp) bei Verapamilzugabe in geringen Konzentrationen stimulierte ATPase Aktivität, obwohl Verapamil kein Transportsubstrat ist, während es in hohen Konzentrationen hemmend wirkt [72]. Weiter kompliziert werden die Untersuchungen durch die Tatsache dass ABC-Transporter eine basale ATPase Aktivität haben, die beeinflusst wird durch die Lipidumgebung und die experimentellen Bedingungen, so bewirkt z.B. intensives Waschen der Matrix bei der Affinitätsaufreinigung eine verstärkte Delipidierung, was die Aktivität der ABC-Transporter beeinflussen kann.

Die Ergebnisse der Trappingexperimente, die bei Zugabe von Metallfluoriden zeigten, dass ADP in Pxa1p und Pxa2p getrappt wurde, und die vollständige Inhibierung der ATPase Aktivität durch Berylliumfluorid liefern einen sehr starken Hinweis auf die ATPase Aktivität von Pxa1p-Pxa2p. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kontaminationen an der gemessenen ATPase Aktivität beteiligt sind. Die Kontrollmessungen ohne MgCl_2 und mit ADP statt ATP zeigten keine Aktivität. Dies entspricht den universellen Eigenschaften von ABC-Transportern, die generell eine Magnesiumabhängigkeit zeigen und nicht in der Lage sind, ADP zu hydrolysieren. Im Gegensatz dazu gibt es MgCl_2 unabhängige ATPasen und Phosphatasen, die sowohl ATP als auch ADP und AMP hydrolysieren können, eine solche hochaktive Phosphatase wurde bei der Aufreinigung von Pdr5 an Ni-NTA Agarose aus *S. cerevisiae* angereichert, sie hydrolysierte AMP und ADP mit höherer Effizienz als ATP [unveröffentlichte Daten von Robert Ernst, Universität Düsseldorf]. Diese Kontamination kann durch die Kontrollmessungen ausgeschlossen werden (siehe Abb. 35). Die stimulierte ATPase Aktivität mit $100 \mu\text{M Oleoyl-}$

CoA liefert einen starken Hinweis darauf, dass es sich nicht oder nicht nur um eine Kontamination handelt und die Kontrollmessungen mit weiteren potenziellen Substraten stützen dieses Ergebnis (siehe Abb. 36). Neben Oleoyl-CoA (C18:1) konnte bei Palmitoyl-CoA (C16:0) eine stimulierte Aktivität verzeichnet werden, beide Stoffe werden als natürliche Substrate betrachtet. Die Zugabe von Caproyl-CoA (C6:0) hatte überraschenderweise keinen stimulierenden Einfluss, Caproyl-CoA wird jedoch auch nicht als natürliches Substrat betrachtet, da kurzkettige Fettsäuren *in vivo* wahrscheinlich ohne Beteiligung von Pxa1p-Pxa2p als freie Fettsäuren in die Peroxisomen gelangen. Dennoch wurde von Hettema *et al.* gezeigt, dass kurzkettige Fettsäuren (C12:0) Pxa1p-Pxa2p abhängig transportiert werden, wenn die Acyl-CoA Synthetase Faa2p aus den Peroxisomen in das Zytosol umgeleitet wird und kurzkettige Fettsäuren im Zytosol zu CoA Estern aktiviert werden [33]. Das Ergebnis stimmt jedoch mit Untersuchungen an ABCD1 (ALDP) überein, wo eine Acyl-CoA abhängige Konformationsänderung erst bei einer Kettenlänge von >16 C-Atomen gefunden wurde [27].

Einen ebenfalls teilweise stimulierenden Einfluss hatte freie Ölsäure. Die transversale Beweglichkeit von freier Ölsäure ist, wie gezeigt wurde sehr groß. Sie unterliegt *in vitro* einem schnellen passiven Flip-flop, der nicht Pxa1p-Pxa2p abhängig ist (siehe Abb. 41). Freie Ölsäure ist jedoch sehr unpolar und in wässrigen Lösungen kaum löslich, weshalb sie wahrscheinlich im Zytosol zu CoA aktiviert wird, um die Löslichkeit zu erhöhen und *in vivo* nicht in freier Form auftritt. Die stimulierte Ölsäure ATPase Aktivität könnte Hinweise auf die Substraterkennung liefern, die möglicherweise über die Alkylgruppe und nicht über die polare CoA Kopfgruppe läuft. Das Ergebnis für Lyso-PC zeigt keine Stimulation und bei Acetyl-CoA und Ei-PC sind die Ergebnisse für die Messungen beim C- und beim N-terminal markierten Konstrukt widersprüchlich. Eine Ei-PC Stimulierung wäre erklärbar als Proteinstabilisierung durch Simulation einer membranähnlichen Umgebung. Ei-PC ist jedoch in wässrigen Lösungen ein schwieriges Substrat und kleine Unterschiede der Detergengkonzentration in den Proteinpräparationen bedingen möglicherweise die unterschiedlichen Ergebnisse. Der ATPase stimulierende Effekt von Acetyl-CoA in einer Messung (maximale Stimulierung) und das Ausbleiben eines Effektes in der anderen Messung ist nur durch eine Kontamination erklärbar. Acetyl-CoA ist an vielen Stoffwechselwegen beteiligt und wird von vielen Proteinen als Substrat verwendet. Die Substratkonzentration war in allen Messungen 100 μM , dies liegt im mittleren Bereich (5-160 μM) der natürlichen Acyl-CoA Konzentration in Zellen [22]. Die Konzentration wurde aufgrund der geringen Proteinausbeute bei der Aufreinigung und der aufwendigen ATPase Messungen nicht variiert, die ATPase Aktivität könnte jedoch bei optimaler Substratkonzentration noch steigen.

Zusammengefasst passen die Ergebnisse der ATPase Messungen gut zu einem potenziellen Transporter langkettiger Fettsäure-CoA Ester und es ist aufgrund der spezifischen Stimulierung der ATPase Aktivität durch CoA Ester langkettiger Fettsäuren unwahrscheinlich, dass die ATPase Aktivität überwiegend auf Kontaminationen zurückzuführen ist.

Radioaktive ATPase Messungen zeigten eine vollständige Hemmung durch Berylliumfluorid, wodurch stark gestützt wird, dass die gemessene ATPase Aktivität auf einem ABC-Transporter beruht. Um kontaminierende ATPasen definitiv auszuschließen, könnten weitere Kontrollmessungen mit Inhibitoren wie Oligomycin (Hemmung der F_1F_0 -ATPase), Natriumazid (Hemmung der F_1F_0 -ATPase der Atmungskette), Ouabain (Hemmung von Na^+ - K^+ -ATPasen) und Vanadat (VO_4^{3-} ist ein Analogon des Phosphations, hemmt viele ABC-Transporter und Ca^{2+} -ATPasen) durchgeführt werden. Für die humanen peroxisomalen ABC-Transporter ABCD1 und ABCD2 wurde jedoch gezeigt, dass Vanadat keinen hemmenden Einfluss auf die ATPase Aktivität hat [53].

5.6 Warum zeigten die Mutanten keine reduzierte ATPase Aktivität?

Wie in Abb. 31 gezeigt wurde, ist die ATP Bindung von Pxa1p-Pxa2p unsymmetrisch. Pxa1p bindet deutlich weniger 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP als Pxa2p. Die geringere ATP Bindung von Pxa1p lässt sich von der Sequenz der nukleotidbindenden Domäne von Pxa1p in Abb. 47 ableiten, in der sich degenerierte Motive finden, die die 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung schwächen. Bei dem ebenfalls unsymmetrisch bindenden Heterodimer ABCG5/G8 wurde gezeigt, dass Mutationen in der degenerierten Walker A Domäne von ABCG8 wirkungslos blieben, da diese Domäne auch im Wildtyp wenig Einfluss auf die Nukleotidbindung hat. Dagegen hatten die Mutationen der konservierten Walker A Domäne von ABCG5 K93M (Lysin gegen Methionin) einen starken Einfluss auf die Aktivität und es wurde kein stabiles Heterodimer mehr gebildet [97]. Daraus lässt sich möglicherweise ableiten, warum die Lysin Mutationen in den Walker A Motiven wirkungslos blieben. Bei der geringer bindenden Pxa1p K650E Mutante konnte keine Wirkung erwartet werden, da schon der Wildtyp wenig ATP bindet. Dass die K510E Mutation in Pxa2p, dem Halbtransporter mit der stärkeren 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP Bindung, ebenfalls keinen hemmenden Einfluss auf die ATPase Aktivität hatte, lässt sich möglicherweise mit der unveränderten Stabilität des Dimers erklären (siehe Abb. 37), bei ABCG5/G8 wurde bei Austausch des Lysins in der Walker A Domäne von ABCG5 nicht nur die Funktionalität verringert, sondern es wurde auch die Integrität der ABC-Transporter aufgehoben. Um Kontrollen für ATPase Aktivitätsmessungen und für Transportmessungen im rekonstituierten System zu gewinnen, sollten Mutanten mit der Fähigkeit zur Bildung stabiler Dimere und aufgehobener oder stark reduzierter ATPase Aktivität ohne Erfüllung der Transportfunktion kloniert werden.

Über die Gründe für das Ergebnis, dass die Lysin Mutation im Walker A Motiv von Pxa2p, der stärker bindenden Domäne, zwar im Aktivitätstest bei der Nutzung von Ölsäure als Kohlenstoffquelle deutlich retardiert war, jedoch keine verminderte ATPase Aktivität zeigte, lässt sich nur spekulieren. Bei dem unsymmetrisch bindenden humanen ABC-Transporter ABCB2/B3 (Tap1/Tap2), sind an der Nukleotidbindung in ABCB2 drei degenerierte Motive beteiligt. Trotzdem bindet ABCB2 deutlich mehr 8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP als ABCB3. Eine zusätzliche Lysin Mutation im Walker A Motiv von ABCB2, hatte keine Auswirkung auf die ATP Bindung, nur die Doppelmutante mit Lysin Mutationen in beiden Walker A Domänen (ABCB2 K544M/ABCB3 K509M) zeigte einen Defekt in der Nukleotidbindung. Über die Transportfunktion der Mutanten gibt es keine Angaben [46].

Das Ergebnis in Abschnitt 4.2.7, weist auf eine aufgehobene Transportfunktion der Pxa2p Walker A Mutante bei ungestörter ATP Bindung und Hydrolyse, die wie der Wildtyp substratstimulierbar ist. Hinweise, dass substratstimulierte ATPase Messungen nur begrenzte Aussagekraft haben, sind bereits in der Literatur zu finden, so wurde bei ABCB1 (P-gp) stimulierte ATPase Aktivität bei Zugabe von Verapamil gefunden, obwohl Verapamil kein Transportsubstrat ist [72]. Falls es sich bei der gemessenen ATPase Aktivität der Pxa2p Mutante nicht um eine Kontamination handelt, was unwahrscheinlich ist, weisen die Ergebnisse, zumindest im solubilisierten Zustand, auf eine Entkopplung der ATPase Aktivität vom Transport hin. Dies könnte ebenfalls bedeuten, dass die Modellvorstellungen des Zusammenspiels zwischen Transmembrandomänen und nukleotidbindenden Domänen und das im Moment favorisierte Modell der ATP Bindung und Hydrolyse (siehe Einleitung) auf Pxa1p-Pxa2p nicht voll übertragbar ist. So scheint die Substratbindung der Pxa2p Mutante auch dann die ATP Hydrolyse zu verstärken und ADP und P_i freizusetzen, wenn aufgrund einer Mutation kein Transportzyklus stattfinden kann. Ob diese scheinbare Entkopplung durch die Solubilisierung verursacht ist, mutationsbedingt ist oder auch beim Wildtyp

Pxa1p-Pxa2p vorliegt, lässt sich mittels der vorhandenen Daten nicht klären. Untersuchungen an isolierten NBDs von Hs ALDP und Hs PMP70 zeigten, dass die isolierten NBDs auch ohne zu dimerisieren eine ATPase Aktivität besitzen, die durch Mutationen im Walker A Motiv reduzierbar ist [66]. Die dort gemessene basale Aktivität der WT-NBDs war jedoch ~9 - 27 mal geringer als bei den kompletten Pxa1p-Pxa2p Transportern.

Von Pxa1p wurden bereits in früheren Arbeiten inaktive Mutanten hergestellt. Shani *et al.* führten Mutationen in ein hochkonserviertes Motiv innerhalb der Transmembrandomäne ein. Dieses sogenannte EAA-ähnliche Motiv befindet sich zwischen der TM4 und der TM5 (siehe Anhang Homologievergleich). In diesem EAA-ähnlichen Motiv von Pxa1p (NSEEIAFYQGTAVR) wurde Glutaminsäure 406 gegen Asparaginsäure (E406D) und Glycin 413 gegen Prolin (G413P) ausgetauscht. Die Zahlen stimmen nicht mit Originalveröffentlichung überein, da Shani *et al.* von einer falschen, verkürzten Proteinsequenz ausgingen (siehe Anhang Proteinsequenz Pxa1p). Beide Mutationen führten zu massiv reduzierten β -Oxidationsleistungen bei Wachstum auf Ölsäuremedium. Ob die Mutationen Einfluss auf die Dimerisierung und die ATP Bindung und Hydrolyse haben, ist nicht bekannt. Bei der Immunodetektion der Mutantenstämme nach Organellenfraktionierung im Nycodenz-Dichtegradienten konnten die Pxa1p Mutanten jedoch in den selben Fraktionen mit ähnlicher Konzentration gefunden werden wie das Wildtypprotein, woraus auf die korrekte Lokalisation und unveränderte Stabilität geschlossen wurde [79].

Ein möglicher Ansatz, um stabile Mutanten mit deutlich reduzierter ATPase Aktivität zu klonieren, wäre der Austausch des hochkonservierten Lysins in der Walker A Domäne von Pxa2p gegen Methionin und der gleichzeitige Austausch des Histidins im H-Loop [mündlich Lutz Schmitt, Universität Düsseldorf].

5.7 Beweisen die Transportuntersuchungen, dass Pxa1p-Pxa2p *in vivo* für den Transport langkettiger Acyl-CoA Ester verantwortlich sind?

Proteoliposomen, die durch Rekonstitution detergenssolubilisierter Phospholipide mit BioBeads gebildet wurden, werden in der Literatur als überwiegend unilamellar beschrieben [51, 65]. Die mittlere Größe der Proteoliposomen bei Verwendung von Ei-PC und DDM wird in der Literatur mit ~120 nm angegeben [65]. 1 ml einer 4,5 mM Ei-PC Lösung enthält $4,5 \mu\text{mol Ei-PC} = 2,7 \times 10^{18}$ Moleküle. Bei einer Vesikelgröße von 120 nm Durchmesser, einer Membrandicke von 4 nm und einer Kopfgruppengröße der PC Moleküle von $0,7 \text{ nm}^2$ [51] kann die Anzahl der Vesikel mit Vernachlässigung des Proteineinbaus auf $2,2 \times 10^{13}$ angenommen werden. Die minimale Anzahl an Pxa1p-Pxa2p ABC-Transportern, für eine Versorgung jedes Vesikels mit einem aktiven Transporter beträgt das Doppelte da die Transporter in beiden Orientierungen eingebaut werden können. D.h. mindestens $4,48 \times 10^{13}$ Moleküle Pxa1p-Pxa2p = 74,4 pmol werden benötigt. Somit müssten für jeden Rekonstitutionsansatz 14,7 μg Pxa1p-Pxa2p Dimer ($M = 197100 \text{ g/mol}$) eingesetzt werden. Bei Proteinpräparationen mit ~80% Reinheit kann die benötigte Gesamtproteinmenge bei sehr hoher Einbaurate auf ca. 18,4 μg Protein pro Rekonstitutionsansatz abgeschätzt werden. Da keine 100%ige Einbaueffizienz zu erwarten war, und nicht jedes Pxa1p-Pxa2p Molekül nach der Rekonstitution aktiv ist, wurde die eingesetzte Proteinmenge auf ~30 μg Pxa1p-Pxa2p erhöht, dies entspricht etwa der maximal einsetzbaren Konzentration des C-terminal epitopmarkierten Konstruktes. Bei Rekonstitutionsexperimenten mit dem N-terminal epitopmarkierten Konstrukt, konnten aufgrund der höheren Ausbeuten noch etwas größere Konzentrationen eingesetzt werden, Transportmessungen mit diesen Proteoliposomen blieben jedoch ergebnislos. Dies könnte vier Gründe haben: i) das Konstrukt bindet und

hydrolysiert zwar ATP, besitzt aber keine Transportaktivität; ii) Das Konstrukt wurde mit Galaktoseinduktion exprimiert in einem Stamm, in dem die Peroxisomenbildung mit der entsprechenden Proteinausstattung nicht induzierbar ist, da dazu Ölsäure als Kohlenstoffquelle notwendig wäre. Dem ABC-Transporter könnten andere assoziierte peroxisomale Proteine fehlen, die für den Transport notwendig sind; iii) die N-terminale Lokalisation der FLAG- und His-Epitope verhindert eine effiziente Rekonstitution, iv) Die höhere Proteinkonzentration in den Elutionsfraktionen der Affinitätsaufreinigung hat eine effiziente Rekonstitution verhindert. Dieser Effekt wird von Rothnie *et al.* beschrieben: ABCB1 (P-gp) konnte mit DDM und BioBeads nur im Lipid/Protein Verhältnis von 100:1 (w/w) rekonstituiert werden und nicht im Verhältnis 10:1 [68]. Welcher der Gründe zutreffend ist, konnte aufgrund der beschriebenen Nachweisschwierigkeiten nicht ermittelt werden.

Nach der Kalkulation oben, sollten alle Vesikel mindestens einen Pxa1p-Pxa2p Transporter enthalten, dies bedeutet, dass die theoretische Akkumulation von SL-Oleoyl-CoA im Innern der Proteoliposomen, nach Inkubation mit Mg ATP, bis zu 100% betragen könnte. Es wurde jedoch nur eine Netto-Akkumulation von maximal 17% verzeichnet. Dies könnte auf eine schlechte Einbaurate, eine massive Schädigung der Proteine während der Rekonstitution, undichte Vesikel, eine sterische Hinderung oder Micellenbildung zurückzuführen sein.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proteoliposomen blieb aufgrund der niedrigen Konzentration ohne Ergebnis, weshalb keine Aussage über die Einbaurate gemacht werden kann. Bei der Analyse von Proteoliposomen nach vorheriger Delipidierung [95] mittels Coomassie-Blau gefärbtem SDS-Gel und Immunoblot in Abb. 42 war in der Coomassie-Färbung keine Bande für Pxa1p und Pxa2p erkennbar, jedoch Proteinbanden die in der eingesetzten Probe nicht vorhanden waren. Im Immunoblot mit α FLAG (M2)-AK war dagegen eine Pxa2p zu sehen, die beweist, dass Pxa2p in den Proteoliposomen enthalten war. Die Proteine, die in der Coomassie-Blau Färbung zu sehen waren, waren sowohl kleiner als auch größer als das eingesetzte Material, d.h. es konnten nicht nur Abbauprodukte sein, sondern es musste sich dabei auch um Aggregationsprodukte handeln. Es ließ sich nicht klären, ob die Veränderungen bei der Rekonstitution oder bei der Delipidierung entstanden sind. Die Delipidierung von Proteoliposomen mit geringen Proteinkonzentrationen vor der elektrophoretischen Trennung ist eine gebräuchliche Methode und wurde bei anderen ABC-Transportern erfolgreich eingesetzt [3]. Unabhängig davon, um welche Art der Modifikation es sich handelt, sollten alle Proteine, die das FLAG-Epitop tragen im Western-blot nachweisbar sein. Von den neu aufgetretenen Banden zeigte jedoch keine ein Signal nach Inkubation mit α FLAG (M2)-AK. Die Experimente verdeutlichen, dass Pxa1p-Pxa2p sich nach Konzentrierungsschritten ungewöhnlich verhält, dies hängt vermutlich mit der hohen Aggregationsneigung aufgrund großer hydrophober Bereiche zusammen.

Das aufgereinigte Protein zeigte basale und Oleoyl-CoA stimulierbare ATPase Aktivität und es zeigte einen Transport von SL-Oleoyl-CoA bei Rekonstitution in Proteoliposomen. Diese Netto-Akkumulation von maximal ~17% war signifikant, jedoch weit vom theoretischen Maximum entfernt. Dennoch zeigen die reproduzierbaren Ergebnisse, einen eindeutigen Transporteffekt, der beweist, dass Pxa1p-Pxa2p *in vitro* verantwortlich für den Transport von SL-Oleoyl-CoA ist. Kontrollmessungen mit transportinaktiven Mutanten stehen noch aus. Zusammen mit den publizierten biochemischen Daten liefern die Ergebnisse dieser Arbeit einen starken Hinweis darauf, dass Pxa1p-Pxa2p auch *in vivo* für den Transport von Oleoyl-CoA zuständig ist.

5.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden dass Pxa1p-Pxa2p im rekonstituierten System unter Zugabe von ATP in der Lage ist SL-Oleoyl-CoA über die Membran zu transportieren. Das Ergebnis sollte nochmals gestützt werden durch den Einsatz inaktiver Mutanten als Kontrolle. Die in dieser Arbeit beschriebenen Walker A Mutanten zeigten weder eine reduzierte basale ATPase Aktivität, noch ein Ausbleiben der Substratstimulierbarkeit. Dieses Ergebnis stimmt für die Walker A Mutante in Pxa1p mit dem Wachstumstest überein, wo ebenfalls volle Funktionalität erkennbar war. Die Walker A Mutante in Pxa2p zeigte jedoch deutlich reduziertes Wachstum, was trotz der unveränderten ATPase Aktivität auf eine beeinträchtigte Transportfunktion schließen lässt. Diese Mutante könnte als Kontrolle für Transportmessungen eingesetzt werden, falls es nicht gelingt in absehbarer Zeit völlig inaktive aber stabile Mutanten zu generieren. Neben den nukleotidbindenden Domänen könnten weitere Mutationen innerhalb der Transmembrandomänen im EAA-ähnlichen Motiv oder im Loop-Motiv wie bei Shani *et al.* beschrieben, eingefügt werden [79].

Die substratstimulierten ATPase Messungen dieser Arbeit liefern interessante Ansätze zur weiteren Erforschung der Substratspezifität von Pxa1p-Pxa2p. Während die langkettigen Coenzym A Ester von Ölsäure und Palmitinsäure als Substrate erkannt werden, hat der kurzkettige Caproyl-CoA Ester (C6:0) keine stimulierende Wirkung auf die ATPase Aktivität, obwohl von Hettema *et al.* gezeigt wurde, dass auch kurzkettige Fettsäuren Pxa1p-Pxa2p abhängig transportiert werden, wenn das für die Acetylierung zuständige Enzym ins Zytosol umgeleitet wird [33].

Nach Optimierung der Rekonstitution könnten Transportuntersuchungen mit einer breiteren Substratpalette durchgeführt werden. Dies könnte ESR-spektroskopisch erfolgen, sofern die Substanzen mit Spin-Label verfügbar sind. Besonders interessant wären Transportexperimente mit „giant unilamellar vesicles“ (GUVs), da hier unmarkierte Substrate eingesetzt werden können. GUVs sind große Vesikel mit einem Durchmesser von ~9µm, die sich innerhalb der Auflösungsgrenze von Lichtmikroskopen bewegen. Erste Experimente zeigten, dass durch die Zugabe von Oleoyl-CoA zu Ei-PC GUVs eine stabile Formveränderung induziert wird, während die Formveränderung für Ölsäure reversibel ist (Abb. 48). Diese Formveränderung beruht auf einem Einbau und Verbleib der Moleküle in der äußeren Schicht und dem daraus resultierenden Flächenungleichgewicht. Bei Proteoliposomen mit Pxa1p-Pxa2p sollte sich die Formveränderung nach Zugabe von ATP zurückbilden, wenn das Fettsäurederivat transportiert wird. Transportexperimente mit GUVs könnten außerdem dazu genutzt werden, die humanen peroxisomalen ABC-Transporter zu untersuchen. Dort sind weder die Dimerisierungspartner noch die Transportsubstrate geklärt. Als mögliche Substrate werden sowohl überlangkettige als auch verzweigte Fettsäuren in ihrer freien und CoA-aktivierten Form diskutiert.

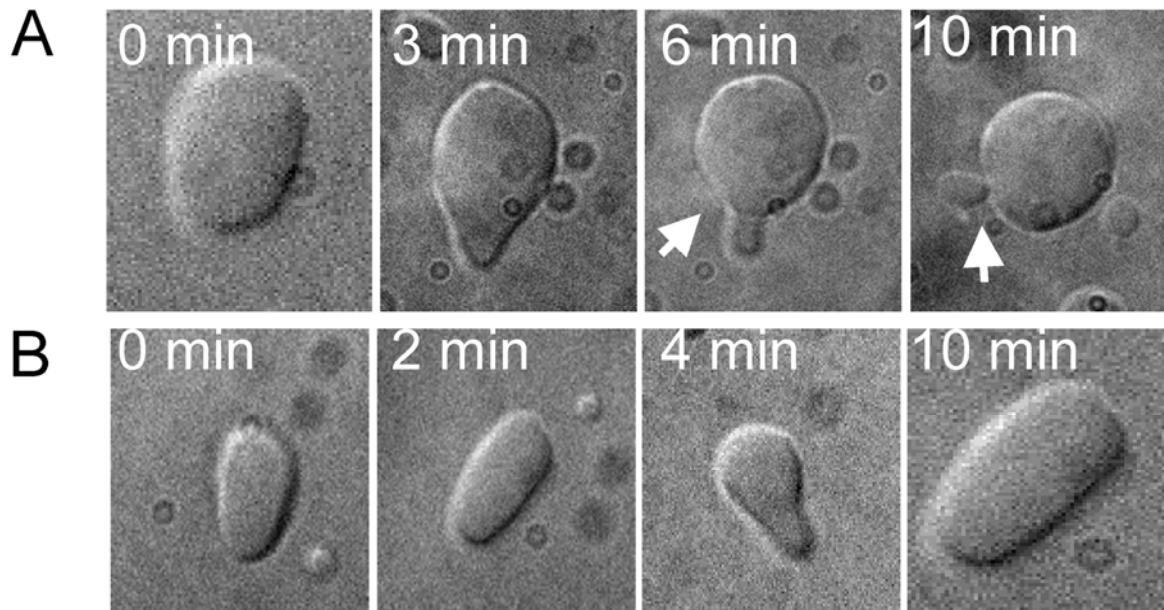


Abb. 48: Formveränderung nach Zugabe von (A) Oleoyl-CoA und (B) Ölsäure zu Ei-PC GUVs. Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurde Oleoyl-CoA und Ölsäure zugegeben. Der Einbau der Moleküle in die äußere Schicht verursachte einen Flächenunterschied zwischen der äußeren und der inneren Lipidschicht, der zu einer stabilen Formveränderung und einer Struktur führt, die Ähnlichkeit mit einer sprossenden Hefe hat (Pfeil). Im Fall von Ölsäure in (B) war die Formveränderung reversibel und die ursprüngliche längliche Form wurde innerhalb der ersten 10 min wieder hergestellt, was als schneller Flip-flop der freien Ölsäure interpretiert werden kann. Das dargestellte Experiment wurde von Lara Kutschenko im Rahmen einer von mir mitbetreuten Projektstudie durchgeführt.

Literatur

- [1] Alaimo, C.; Catrein, I.; Morf, L.; Marolda, C. L.; Callewaert, N.; Valvano, M. A.; Feldman, M. F. und Aebi, M. (2006): Two distinct but interchangeable mechanisms for flipping of lipid-linked oligosaccharides, *Embo J* (Band 25), Nr. 5, Seite 967-76.
- [2] Ambudkar, S. V.; Kim, I. W.; Xia, D. und Sauna, Z. E. (2006): The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding, *FEBS Lett* (Band 580), Nr. 4, Seite 1049-55.
- [3] Ambudkar, S. V.; Lelong, I. H.; Zhang, J.; Cardarelli, C. O.; Gottesman, M. M. und Pastan, I. (1992): Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 18, Seite 8472-6.
- [4] Ausubel, F.M.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A. und Struhl, K. (2002): *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc, ISBN: 0471250961.
- [5] Baker, A. und Sparkes, I. A. (2005): Peroxisome protein import: some answers, more questions, *Curr Opin Plant Biol* (Band 8), Nr. 6, Seite 640-7.
- [6] Beitz, E. (2000): T(E)Xtopo: shaded membrane protein topology plots in LAT(E)X2epsilon, *Bioinformatics* (Band 16), Nr. 11, Seite 1050-1.
- [7] Beitz, E. (2000): TEXshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon, *Bioinformatics* (Band 16), Nr. 2, Seite 135-9.
- [8] Berger, J. und Gartner, J. (2006): X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, biochemical and pathogenic aspects, *Biochim Biophys Acta* (Band 1763), Nr. 12, Seite 1721-32.
- [9] Boukh-Viner, T. und Titorenko, V. I. (2006): Lipids and lipid domains in the peroxisomal membrane of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Biochim Biophys Acta* (Band 1763), Nr. 12, Seite 1688-96.
- [10] Brown, L. A. und Baker, A. (2003): Peroxisome biogenesis and the role of protein import, *J Cell Mol Med* (Band 7), Nr. 4, Seite 388-400.
- [11] Cartwright, J. L.; Gasmi, L.; Spiller, D. G. und McLennan, A. G. (2000): The *Saccharomyces cerevisiae* PCD1 gene encodes a peroxisomal nudix hydrolase active toward coenzyme A and its derivatives, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 42, Seite 32925-30.
- [12] Chang, G. (2003): Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation, *J Mol Biol* (Band 330), Nr. 2, Seite 419-30.
- [13] Chang, X. B.; Hou, Y. X. und Riordan, J. R. (1997): ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 49, Seite 30962-8.
- [14] Chen, M.; Abele, R. und Tampe, R. (2003): Peptides induce ATP hydrolysis at both subunits of the transporter associated with antigen processing, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 32, Seite 29686-92.
- [15] Copeland, Robert Allen (1996): *Enzymes a practical introduction to structure, mechanism and data analysis*, Wiley-VCH, New York Cambridge.
- [16] Davidson, A. L. und Chen, J. (2005): Structural biology. Flipping lipids: is the third time the charm? *Science* (Band 308), Nr. 5724, Seite 963-5.
- [17] Dawson, R. J. und Locher, K. P. (2006): Structure of a bacterial multidrug ABC transporter, *Nature* (Band 443), Nr. 7108, Seite 180-5.
- [18] Dean, M.; Rzhetsky, A. und Allikmets, R. (2001): The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Genome Res* (Band 11), Nr. 7, Seite 1156-66.
- [19] Distel, B. und Kragt, A. (2005): *Purification of Yeast Peroxisomes*, Xiao, W., *Yeast Protocols* (Band 313) Seite 21-26, Humana Press Inc.
- [20] Doerrler, W. T. und Raetz, C. R. (2002): ATPase activity of the MsbA lipid flippase of *Escherichia coli*, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 39, Seite 36697-705.
- [21] Erdmann, R. und Blobel, G. (1995): Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p, *J Cell Biol* (Band 128), Nr. 4, Seite 509-23.
- [22] Faergeman, N. J. und Knudsen, J. (1997): Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling, *Biochem J* (Band 323 (Pt 1)), Seite 1-12.
- [23] Ferreira-Pereira, A.; Marco, S.; Decottignies, A.; Nader, J.; Goffeau, A. und Rigaud, J. L. (2003): Three-dimensional reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance protein Pdr5p, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 14, Seite 11995-9.

- [24] Figler, R. A.; Omote, H.; Nakamoto, R. K. und Al-Shawi, M. K. (2000): Use of chemical chaperones in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein, *Arch Biochem Biophys* (Band 376), Nr. 1, Seite 34-46.
- [25] Frelet, A. und Klein, M. (2006): Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis, *FEBS Lett* (Band 580), Nr. 4, Seite 1064-84.
- [26] Fujiki, Y.; Matsuzono, Y.; Matsuzaki, T. und Fransen, M. (2006): Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p- and Pex19p-mediated interactions, *Biochim Biophys Acta* (Band 1763), Nr. 12, Seite 1639-46.
- [27] Guimaraes, C. P.; Sa-Miranda, C. und Azevedo, J. E. (2005): Probing substrate-induced conformational alterations in adrenoleukodystrophy protein by proteolysis, *J Hum Genet* (Band 50), Nr. 2, Seite 99-105.
- [28] Guimaraes, C. P.; Domingues, P.; Aubourg, P.; Fouquet, F.; Pujol, A.; Jimenez-Sanchez, G.; Sa-Miranda, C. und Azevedo, J. E. (2004): Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo, *Biochim Biophys Acta* (Band 1689), Nr. 3, Seite 235-43.
- [29] Gurvitz, A. und Rottensteiner, H. (2006): The biochemistry of oleate induction: transcriptional upregulation and peroxisome proliferation, *Biochim Biophys Acta* (Band 1763), Nr. 12, Seite 1392-402.
- [30] Hagmann, W.; Nies, A. T.; Konig, J.; Frey, M.; Zentgraf, H. und Keppler, D. (1999): Purification of the human apical conjugate export pump MRP2 reconstitution and functional characterization as substrate-stimulated ATPase, *Eur J Biochem* (Band 265), Nr. 1, Seite 281-9.
- [31] Heinzer, A. K.; Watkins, P. A.; Lu, J. F.; Kemp, S.; Moser, A. B.; Li, Y. Y.; Mihalik, S.; Powers, J. M. und Smith, K. D. (2003): A very long-chain acyl-CoA synthetase-deficient mouse and its relevance to X-linked adrenoleukodystrophy, *Hum Mol Genet* (Band 12), Nr. 10, Seite 1145-54.
- [32] Hettema, E. H. und Tabak, H. F. (2000): Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane, *Biochim Biophys Acta* (Band 1486), Nr. 1, Seite 18-27.
- [33] Hettema, E. H.; van Roermund, C. W.; Distel, B.; van den Berg, M.; Vilela, C.; Rodrigues-Pousada, C.; Wanders, R. J. und Tabak, H. F. (1996): The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*, *Embo J* (Band 15), Nr. 15, Seite 3813-22.
- [34] Higgins, C. F. (2007): Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters, *Nature* (Band 446), Nr. 7137, Seite 749-57.
- [35] Higgins, C. F. und Linton, K. J. (2004): The ATP switch model for ABC transporters, *Nat Struct Mol Biol* (Band 11), Nr. 10, Seite 918-26.
- [36] Hiltunen, J. K.; Mursula, A. M.; Rottensteiner, H.; Wierenga, R. K.; Kastaniotis, A. J. und Gurvitz, A. (2003): The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiol Rev* (Band 27), Nr. 1, Seite 35-64.
- [37] Hofacker, M.; Gompf, S.; Zutz, A.; Presenti, C.; Haase, W.; van der Does, C.; Model, K. und Tampe, R. (2006): Structural and functional fingerprint of the mitochondrial ABC transporter MDL1 from *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem*.
- [38] Hosie, A. H.; Allaway, D.; Jones, M. A.; Walshaw, D. L.; Johnston, A. W. und Poole, P. S. (2001): Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake, *Mol Microbiol* (Band 40), Nr. 6, Seite 1449-59.
- [39] Hou, Y. X.; Cui, L.; Riordan, J. R. und Chang, X. B. (2002): ATP binding to the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance protein MRP1 increases binding and hydrolysis of ATP and trapping of ADP at the second domain, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 7, Seite 5110-9.
- [40] Jungwirth, H. und Kuchler, K. (2006): Yeast ABC transporters-- a tale of sex, stress, drugs and aging, *FEBS Lett* (Band 580), Nr. 4, Seite 1131-8.
- [41] Kaplan, R. S. und Pedersen, P. L. (1989): Sensitive protein assay in presence of high levels of lipid, *Methods Enzymol* (Band 172), Seite 393-9.
- [42] Kasuya, F.; Oti, Y.; Tatsuki, T. und Igarashi, K. (2004): Analysis of medium-chain acyl-coenzyme A esters in mouse tissues by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *Anal Biochem* (Band 325), Nr. 2, Seite 196-205.
- [43] Kawaguchi, A.; Yoshimura, T. und Okuda, S. (1981): A new method for the preparation of acyl-CoA thioesters, *J Biochem (Tokyo)* (Band 89), Nr. 2, Seite 337-9.
- [44] Kimura, Y.; Shibasaki, S.; Morisato, K.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Matsuo, M.; Amachi, T.; Ueda, M. und Ueda, K. (2004): Microanalysis for MDR1 ATPase by high-performance liquid chromatography with a titanium dioxide column, *Anal Biochem* (Band 326), Nr. 2, Seite 262-6.

- [45] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (Band 227), Nr. 5259, Seite 680-5.
- [46] Lapinski, P. E.; Raghuraman, G. und Raghavan, M. (2003): Nucleotide interactions with membrane-bound transporter associated with antigen processing proteins, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 10, Seite 8229-37.
- [47] Leighton, F.; Poole, B.; Beaufay, H.; Baudhuin, P.; Coffey, J. W.; Fowler, S. und De Duve, C. (1968): The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions, *J Cell Biol* (Band 37), Nr. 2, Seite 482-513.
- [48] Linton, K. J. (2007): Structure and Function of ABC Transporters, *Physiology* (Bethesda) (Band 22), Seite 122-30.
- [49] Liu, L. X.; Janvier, K.; Berteaux-Lecellier, V.; Cartier, N.; Benarous, R. und Aubourg, P. (1999): Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters, *J Biol Chem* (Band 274), Nr. 46, Seite 32738-43.
- [50] Longtine, M. S.; McKenzie, A., 3rd; Demarini, D. J.; Shah, N. G.; Wach, A.; Brachat, A.; Philippsen, P. und Pringle, J. R. (1998): Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* (Band 14), Nr. 10, Seite 953-61.
- [51] Menon, A. K.; Watkins, W. E. und Hrafnisdottir, S. (2000): Specific proteins are required to translocate phosphatidylcholine bidirectionally across the endoplasmic reticulum, *Curr Biol* (Band 10), Nr. 5, Seite 241-52.
- [52] Morbach, S.; Tebbe, S. und Schneider, E. (1993): The ATP-binding cassette (ABC) transporter for maltose/maltodextrins of *Salmonella typhimurium*. Characterization of the ATPase activity associated with the purified MalK subunit, *J Biol Chem* (Band 268), Nr. 25, Seite 18617-21.
- [53] Morita, M.; Kurisu, M.; Kashiwayama, Y.; Yokota, S. und Imanaka, T. (2006): ATP-binding and -hydrolysis activities of ALDP (ABCD1) and ALDRP (ABCD2), human peroxisomal ABC proteins, overexpressed in Sf21 cells, *Biol Pharm Bull* (Band 29), Nr. 9, Seite 1836-42.
- [54] Nau, Katja (2002): Identifizierung und Funktionsanalyse von peroxisomalen Proteinen, Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin, Berlin.
- [55] Omote, H. und Al-Shawi, M. K. (2002): A novel electron paramagnetic resonance approach to determine the mechanism of drug transport by P-glycoprotein, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 47, Seite 45688-94.
- [56] Palmieri, L.; Rottensteiner, H.; Girzalsky, W.; Scarcia, P.; Palmieri, F. und Erdmann, R. (2001): Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter, *Embo J* (Band 20), Nr. 18, Seite 5049-59.
- [57] Pohl, A.; Devaux, P. F. und Herrmann, A. (2005): Function of prokaryotic and eukaryotic ABC proteins in lipid transport, *Biochim Biophys Acta* (Band 1733), Nr. 1, Seite 29-52.
- [58] Pomorski, T. und Menon, A. K. (2006): Lipid flippases and their biological functions, *Cell Mol Life Sci* (Band 63), Nr. 24, Seite 2908-21.
- [59] Poolman, B.; Doeven, M. K.; Geertsma, E. R.; Biemans-Oldehinkel, E.; Konings, W. N. und Rees, D. C. (2005): Functional analysis of detergent-solubilized and membrane-reconstituted ATP-binding cassette transporters, *Methods Enzymol* (Band 400), Seite 429-59.
- [60] Prescott, M.; Nowakowski, S.; Gavin, P.; Nagley, P.; Whisstock, J. C. und Devenish, R. J. (2003): Subunit gamma-green fluorescent protein fusions are functionally incorporated into mitochondrial F1F0-ATP synthase, arguing against a rigid cap structure at the top of F1, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 1, Seite 251-6.
- [61] Procko, E.; Ferrin-O'Connell, I.; Ng, S. L. und Gaudet, R. (2006): Distinct structural and functional properties of the ATPase sites in an asymmetric ABC transporter, *Mol Cell* (Band 24), Nr. 1, Seite 51-62.
- [62] Pullman, M. E. (1973): A convenient and versatile method for the purification of CoA thiol esters, *Anal Biochem* (Band 54), Nr. 1, Seite 188-98.
- [63] Ravaud, S.; Do Cao, M. A.; Jidenko, M.; Ebel, C.; Le Maire, M.; Jault, J. M.; Di Pietro, A.; Haser, R. und Aghajari, N. (2006): The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer when in a detergent-solubilized state, *Biochem J* (Band 395), Nr. 2, Seite 345-53.
- [64] Reuter, G.; Janvilisri, T.; Venter, H.; Shahi, S.; Balakrishnan, L. und van Veen, H. W. (2003): The ATP binding cassette multidrug transporter LmrA and lipid transporter MsbA have overlapping substrate specificities, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 37, Seite 35193-8.

- [65] Rigaud, J.-L.; Levy, D.; Mosser, G. und Lambert, O. (1998): Detergent removal by non-polar polystyrene beads, *Eur Biophys J* (Band 27), Nr. 4, Seite 305-319.
- [66] Roerig, P.; Mayerhofer, P.; Holzinger, A. und Gartner, J. (2001): Characterization and functional analysis of the nucleotide binding fold in human peroxisomal ATP binding cassette transporters, *FEBS Lett* (Band 492), Nr. 1-2, Seite 66-72.
- [67] Rost, B.; Yachdav, G. und Liu, J. (2004): The PredictProtein server, *Nucleic Acids Res* (Band 32), Nr. Web Server issue, Seite W321-6.
- [68] Rothnie, A.; Theron, D.; Soceneantu, L.; Martin, C.; Traikia, M.; Berridge, G.; Higgins, C. F.; Devaux, P. F. und Callaghan, R. (2001): The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence, *Eur Biophys J* (Band 30), Nr. 6, Seite 430-42.
- [69] Rottensteiner, H.; Kramer, A.; Lorenzen, S.; Stein, K.; Landgraf, C.; Volkmer-Engert, R. und Erdmann, R. (2004): Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals, *Mol Biol Cell* (Band 15), Nr. 7, Seite 3406-17.
- [70] Russell, P. L. und Sharom, F. J. (2006): Conformational and functional characterization of trapped complexes of the P-glycoprotein multidrug transporter, *Biochem J* (Band 399), Nr. 2, Seite 315-23.
- [71] Sambrook, Joseph und Russell, David William (2001): Molecular cloning a laboratory manual, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring.
- [72] Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G. und Varadi, A. (2006): Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system, *Physiol Rev* (Band 86), Nr. 4, Seite 1179-236.
- [73] Schagger, H. und von Jagow, G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal Biochem* (Band 199), Nr. 2, Seite 223-31.
- [74] Schliebs, W. und Kunau, W. H. (2004): Peroxisome membrane biogenesis: the stage is set, *Curr Biol* (Band 14), Nr. 10, Seite R397-9.
- [75] Schmitt, L.; Benabdelhak, H.; Blight, M. A.; Holland, I. B. und Stubbs, M. T. (2003): Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains, *J Mol Biol* (Band 330), Nr. 2, Seite 333-42.
- [76] Schmitz, G.; Liebisch, G. und Langmann, T. (2006): Lipidomic strategies to study structural and functional defects of ABC-transporters in cellular lipid trafficking, *FEBS Lett* (Band 580), Nr. 23, Seite 5597-610.
- [77] Shani, N. und Valle, D. (1996): A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 21, Seite 11901-6.
- [78] Shani, N.; Watkins, P. A. und Valle, D. (1995): PXA1, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 13, Seite 6012-6.
- [79] Shani, N.; Sapag, A. und Valle, D. (1996): Characterization and analysis of conserved motifs in a peroxisomal ATP-binding cassette transporter, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 15, Seite 8725-30.
- [80] Sharom, F. J.; Yu, X. und Doige, C. A. (1993): Functional reconstitution of drug transport and ATPase activity in proteoliposomes containing partially purified P-glycoprotein, *J Biol Chem* (Band 268), Nr. 32, Seite 24197-202.
- [81] Shimizu, S.; Tani, Y.; Yamada, H.; Tabata, M. und Murachi, T. (1980): Enzymatic determination of serum-free fatty acids: a colorimetric method, *Anal Biochem* (Band 107), Nr. 1, Seite 193-8.
- [82] Smith, K. D.; Kemp, S.; Braiterman, L. T.; Lu, J. F.; Wei, H. M.; Geraghty, M.; Stetten, G.; Bergin, J. S.; Pevsner, J. und Watkins, P. A. (1999): X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes, *Neurochem Res* (Band 24), Nr. 4, Seite 521-35.
- [83] Tabak, H. F.; Hoepfner, D.; Zand, A.; Geuze, H. J.; Braakman, I. und Huynen, M. A. (2006): Formation of peroxisomes: present and past, *Biochim Biophys Acta* (Band 1763), Nr. 12, Seite 1647-54.
- [84] Tanaka, A. R.; Tanabe, K.; Morita, M.; Kurisu, M.; Kasiwayama, Y.; Matsuo, M.; Kioka, N.; Amachi, T.; Imanaka, T. und Ueda, K. (2002): ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1), *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 42, Seite 40142-7.
- [85] Theodoulou, F. L.; Holdsworth, M. und Baker, A. (2006): Peroxisomal ABC transporters, *FEBS Lett* (Band 580), Nr. 4, Seite 1139-55.
- [86] Thieringer, R.; Shio, H.; Han, Y. S.; Cohen, G. und Lazarow, P. B. (1991): Peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*: immunofluorescence analysis and import of catalase A into isolated peroxisomes, *Mol Cell Biol* (Band 11), Nr. 1, Seite 510-22.

- [87] Van Ael, E. und Fransen, M. (2006): Targeting signals in peroxisomal membrane proteins, *Biochim Biophys Acta* (Band 1763), Nr. 12, Seite 1629-38.
- [88] van Roermund, C. W.; Waterham, H. R.; Ijlst, L. und Wanders, R. J. (2003): Fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Cell Mol Life Sci* (Band 60), Nr. 9, Seite 1838-51.
- [89] Veit, M. (2000): Palmitoylation of the 25-kDa synaptosomal protein (SNAP-25) in vitro occurs in the absence of an enzyme, but is stimulated by binding to syntaxin, *Biochem J* (Band 345 Pt 1), Seite 145-51.
- [90] Visser, W. F.; van Roermund, C. W.; Ijlst, L.; Waterham, H. R. und Wanders, R. J. (2007): Metabolite transport across the peroxisomal membrane, *Biochem J* (Band 401), Nr. 2, Seite 365-75.
- [91] Wanders, R. J. und Waterham, H. R. (2006): Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited, *Annu Rev Biochem* (Band 75), Seite 295-332.
- [92] Wanders, R. J.; Visser, W. F.; van Roermund, C. W.; Kemp, S. und Waterham, H. R. (2007): The peroxisomal ABC transporter family, *Pflugers Arch* (Band 453), Nr. 5, Seite 719-734.
- [93] Wang, Z.; Stalcup, L. D.; Harvey, B. J.; Weber, J.; Chloupkova, M.; Dumont, M. E.; Dean, M. und Urbatsch, I. L. (2006): Purification and ATP hydrolysis of the putative cholesterol transporters ABCG5 and ABCG8, *Biochemistry* (Band 45), Nr. 32, Seite 9929-39.
- [94] Webb, M. R. (1992): A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 89), Nr. 11, Seite 4884-7.
- [95] Wessel, D. und Flugge, U. I. (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids, *Anal Biochem* (Band 138), Nr. 1, Seite 141-3.
- [96] Yoshida, M.; Sone, N.; Hirata, H. und Kagawa, Y. (1975): A highly stable adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium. Purification, properties, and reconstitution, *J Biol Chem* (Band 250), Nr. 19, Seite 7910-6.
- [97] Zhang, D. W.; Graf, G. A.; Gerard, R. D.; Cohen, J. C. und Hobbs, H. H. (2006): Functional asymmetry of nucleotide-binding domains in ABCG5 and ABCG8, *J Biol Chem* (Band 281), Nr. 7, Seite 4507-16.
- [98] Zolman, B. K.; Silva, I. D. und Bartel, B. (2001): The Arabidopsis pxa1 mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation, *Plant Physiol* (Band 127), Nr. 3, Seite 1266-78.

Anhang

Sequenzen

Aminosäuren- und Gensequenz von Pxa1

Von Pxa1 existieren in der Literatur und in Datenbanken zwei Sequenzen. Eine Sequenz für ein 870 AS Protein (GenID: 855956) mit einem Molekulargewicht von 100 kDa und ein N-terminal trunkiertes Protein mit 758 AS (GenID: 619668) und einem Gewicht von 86,9 kDa [33, 78].

```

1  atgtcaacaa cattagcagc accagcgaaa ctaaagagtt tgctcctgaa tctacatact cactgtattg ggctacacgt taacgatgtc acacctaaag
   M S T T L A A P A K L K S L L L N L H T H C I G L H V N D V T P K
101 tatatttcaa gttattgata cggcatcttc tacagatata tagatcaaac gctgctcctc ctaagctaag aagaaggggc cagattttat tggatcgct
   V Y F K L L I R H L L Q I S R S N A A H P K L R R R A Q I L L V S
201 ttctctatct ggtgtcacac tttttctctg tgtaacatat agtactttca aaattattctt aaaatgttat aaattttaca agtttccatg gaagagaagg
   L F L S G V T L F S G V T Y S T F K I I L K C Y K F Y K F P W K R R
301 aataggagac ctttaataag aagaacaaga tctcaaatgc aattagacag tgggtgcaaga ataattgata ttcctgaagt ggaattagtc gaccgccaga
   N R R P L I R R T R S Q M Q L D S G A R I M Y I P E V E L V D R Q
401 gtcccgatga caacaaattt atgaatgcta cagataaaaa aaaaaggaaa aggatattta ttccacaaaa ggataacgat gtatatgaac acgataagtt
   S P D D N K F M N A T D K K K R K R I F I P P K D N D V Y E H D K
501 tctttttaaa aatgtagaac tggaaagagc caagaattcg cagtattctt actcaaaatt tttaaaccaa atgaacgtct tgtctaaaat tttaattcca
   F L F K N V E L E R A K N S Q T L F Y S K F L N Q M N V L S K I L I P
601 acagtttttg acaaaaactt tcttctttta actgctcaaa ttttttctct ggtgatgaga acttggtctt ctttgtttgt agccaagctg gatggacaaa
   T V F D K N F L L L T A Q I F F L V M R T W L S L F V A K L D G Q
701 tagtcaaaaa tataattgct ggtagaggaa gaagctttct gtgggactta ggggtgttgtt ttttaattgc tgtccctgct tcttatacta atagtgttat
   I V K N I I A G R G R S F L W D L G C W F L I A V P A S Y T N S A
801 taagctactt caaaggaagt tgagttttaa ctttagggta aatttgacac gttacatcca tgacatgtat ttggataaaa gactaacatt ttacaaatta
   I K L L Q R K L S L N F R V N L T R Y I H D M Y L D K R L T F Y K L
901 atttttgatg caaaggcgtc caattcggta atcaagaata tcgacaactc cactactaat gatgttgcaa aattttgcga tgcgacatgc tccgtttttg
   I F D A K A S N S V I K N I D N S I T N D V A K F C D A T C S V F
1001 caaacattgc aaagccagtt attgatttaa tattcttttc ggttatttta cgtgataaatt tgggaactgt gggagtagca ggtatatatt ttaattattt
   A N I A K P V I D L I F F S V Y L R D N L G T V G V A G I F V N Y
1101 cactactggg tttattttga ggaatacac gccaccatta ggtaaatagg caggcgagag atctgtctca gacggcagat actacaatta tcactaaac
   F I T G F I L R K Y T P P L G K L A G E R S A S D G D R L T Y H L N
1201 atgataataa atagcgaaga gatcgcatth taccaaggaa cagcagtggg aaggacgaaa gttaaagagt tgtatgatgt gctgatggaa aaaatgctgc
   M I N N S E E I A F Y Q G T A V E R T K V K E L Y D V L M E K M L
1301 tgggtgataa agtcaagttt ggttacaata tggttgaaga ctatgtttta aaatatacat ggtccggttt ggggtatggt ttgacctcaa tccctatcgt
   L V D K V K F G Y N M L E D Y V L K Y T W S G L G Y V F A S I P I
1401 tatgtctacc ttagcgacag gcatcaattc agaggaaaaa aatatgaagg aattttatgt caacaaaagg ttgatgttgt cgcttgcala tgcaggctcg
   V M S E T G I N S E E K N M K E F I V N K R L M L S L C A G S
1501 agattgatgc attcgataaa ggacatctca caattgacgg gctacactaa taggatattt actctgcttt ccgtcttaca cagggttcac tctctgaact
   R L M H S I K D I S Q L T G Y T N R I F T L L S V L H R V H S L N
1601 ttaattacgg cgctgttctt tcaatcctgt caatcgtac agaagacgct tccagaaatt ccaacttatt accaccacg gataattcgc aagatgctat
   F N Y G A V P S I L S I R T E D A S R N S N L L P T T D N S Q D A
1701 tcgtgtgact attcaacgca attttaacgg tattcgggta gaaaatatag acgtaatcat tccatcagta agggcgagcg aaggcataaa gctgattaac
   I R G T I Q R N F N G I R L E N I D V I I P S V R A S E G I K L I N
1801 aagcttacat ttcaaattcc ttgtcatatt gacccaataa cttcaaagtc caattctata caagacttat cgaaggcaaa tgatataaag ttaccatttt
   K L T F Q I P L H I D P I T S K S N S I Q D L S K A N D I K L P F
1901 tgcagggttc tggctccagc ctgttaatat tagggccaaa tgggtgcggt aaaagttcaa ttcaacgcat tatagctgaa atatggccag tgtataacaa
   L Q G S G S S L L I L G P N G C G K S S I Q R I I A E I W P V Y N
2001 aaatggatta ttgtcgattc cttcagaaaa taatattttt ttattctctc agaaaccata ttttagtaga ggtggaactt taagagacca aattatatac
   K N G L L S I P S E N N I F F I P Q K P Y F S R G G T L R D Q I I Y
2101 cccatgtctc cggtgaattt ctttgatagg gggtttagag ataaggagct agtacagata ttagtccaag tgaaactaga ttatctttta aaaagaggcg
   P M S S D E F F D R G F R D K E L V Q I L V E V K L D Y L L K R G
2201 ttggcttaac ttacctagat gccattgccg attggaagga cttattaagt ggtgggtgaaa agcaaagagt aaattttgct agaattcatg ttcataaacc
   V G L T Y L D A I A D W K D L L S G G E K Q R V N F A R I M F H K
2301 actatacgta gtattagatg aggtctacaa cgcaattagt gttgacdmg aagactatct gttcaatctt ttaaaacgat acagattcaa tttctttoc
   P L Y V L D E A T V N A I S V D M E D Y L F N L L K R Y R F N F I S
2401 atatcacaaa gaccacattt aatcaaatat catgaaatgt tactagagat cggtgaaaat cgagatggca aatggcaatt acaggcagtt ggtaccgatg
   I S Q R P T L I K Y H E M L L E I G E N R D G K W Q L Q A V G T D
2501 aagcaatcac gtcgattgac aacgagattg aggaattgga gagaaaaacta gaaagagtaa aagggttgga agatgagagg acgaagctac gggaaaaagct
   E A I T S I D N E I E E L E R K L E R V K G W E D E R T K L R E K
2601 tgaaaattatt tga
   L E I I -

```

Abb. 49: Zwei Varianten der Gen- und Proteinsequenz von Pxa1. Grün markiert sind die Sequenzabschnitte die bei der trunkierten Variante fehlen. Unsere Expressionskonstrukte bestehen aus der langen Variante, ihr Migrationsverhalten im SDS-Gel bzw. bei der Immunodetektion entspricht dem nativen Protein (Daten nicht gezeigt). Durch ESI-MS Sequenzierung von aufgereinigtem, epitopmarkiertem Pxa1p aus einer SDS-PAGE konnte die Sequenz verifiziert werden.

Aminosäuren- und Gensequenz von Pxa2

```

1  atgatctcaa cagcttctgc attttatcag aagcatagag taaatttact gcgttcttca tacataatat tgttgctagc cagcgtttac aattcaaat
   M I S T A S A F Y Q K H R V N L L R S S Y I I L L L A T L Y N S N
101 ccagttctag taacaacaaa actgataaga aggattctga gtcaacggtt ttagaaaata agaaaattga agagggaata gaaaccgcag tagatagaga
   S S S S N N K T D K K D S E S T V L E N K K I E E G K E T A V D R
201 ggaagatgaa agtagctaac aagagttaac gatagtctcc aaacatagca cagattcaga agatggtgca ataataattg ataagaaag caagactaat
   E E D E S S K E E L T I V S K H S T D S E D G A I I I D K E S K T N
301 cataaggggg gagagcgaag aggaagagga gattttttgt tcaaaacttt gcttcatgat aagaagtgcc tcattttatt tattacacag gctattcttc
   H K G G E R K G K V D F L F K L L L H D K K C L I L F I T Q A I L
401 tgaacatcag aacattgctg tctcttcgtg tggctacttt agatggtcaa ttagtgtcca cactagtaag agctcaatac gcaaacttca caaagatatt
   L N I R T L L S L R V A T L D G Q L V S T L V R A Q Y A N F T K I
501 gttggggaaa tggatgatcc ttggaattcc cgccagtttt attaatcacc tgatcagtta cagcagaaaa ctttgtgctg tcattattaa taggaaagtt
   L L G K W M I L G I P A S F I N S L I S Y T T K L C A V T I N R K V
601 tcagactttc tactctcaaa gtatctatct aatcaccata ctttctattc cgtagcttct gctgaatctg ttccagaaat tcaggataat ttgacaaaag
   S D F L L S K Y L S N H H T F Y S V A S A E S V S E I Q D N L T K
701 atatttacac attttcaatg aactcgtcat tattactgaa tcagctatta aagccaatgc tggatttgat cctctgttca ttcaaatatt taacctcaaa
   D I Y T F S M N S S L L L N Q L L K P M L D L I L C S F K L L T S
801 cactagtgtt atgggtgaag gaactttggc actgggctta attgtctacg cctccaatcc attactaaaa ttgattcaac cgaatttcac taggttaact
   N T S V M G E G T L A L G L I V Y A S N S L L K L I Q P N F T R L T
901 atggcaagcg catctttgga aagtgtgttc agatctttac actcgaatct acattcaagc aatgaagaaa ttgcactgct aagagggcaa aagagggaac
   M A S A S L E S W F R S L H S N L H S S N E E I A L L R G Q K R E
1001 tagaaaaagt tgattattca ttttacogtt tgggtgctatt tttaaacaga gaaataaagg caagagctat ttatgatgtt gctactgcat ttgtcattaa
   L E N V D Y S F Y R L V L F L N R E I K A R A I Y D V A T A F V I
1101 atatacttgg ggccgagctg gcttggctact atgctcgatt ccaatatatt tcaaaaacaa acctagttaa gacaccttac agcttaagga acccggaat
   K Y T W G A A G L V L C S I P I F F K N K P S E D T L Q L K E P G N
1201 gatatgacgg ctgatttcat cacaataaga agattattag tcaactgcatc tagctctatc ggaagatttg tggaactgaa gagaataata caacaattac
   D M T A D F I T N R R L L V T A S S S I G R F V E L K R N I Q Q L
1301 gcgggtatcag attgagattg aacaagtcca atgatttgtt ggatgctaata aaaggtgatg acgaaaaaga accaagagat gaaaggtgta tagtgaata
   R G I R L R L N K F N D L L D A N K G D D E K E P R D E R C I V E
1401 tgatgatcca aggataaagt ttgaaaatat tcctttaata acacctgcca atcaagttct agtaccggag ctaagttttg atctgaagca tggaaatcat
   Y D D S R I K F E N I P L I T P A N Q V L V P E L S F D L K H G N H
1501 ctactaatta ttgggcccaa cggttgcggtt aaatcttcat tatttcgtat tctaggcggg ctttggccga taaggcgagc tcccaataaa aatcatcaat
   L I S I G P N G C G K S S L T F R I L G G L W P I R A T P N K E P G Q
1601 ccaagttaat aatgccgcgt agaactgtgg atagagattg cgcaatatat tatttaccac aaaggccgta tatgggcaat aggtcgacat tcagggaaca
   S K L I M P R R T V D R D C A I F Y L P Q R P Y M G N R S T F R E
1701 gattatttat ccagacagta ttgaacaatt caaagaaaga taccacaatg attatgatct aggcgatgca gatttaataa aaattctgca attattagat
   Q I I Y P D S I E Q F K E R Y H N D Y D L G D A D L I K I L Q L L D
1801 ttggaggatt tagtctactg aaatatgtca cttctgtcgg cgcaaaaggac ttccaaaaat gattcacagc agttgtcgac ggaagacaaat cagtcaccat
   L E D L V T E N M S L L L A Q R T S K N D S Q Q L S T E D N Q S P
1901 gcgccattaa agttcgtgat gcattcagta tagtaagaaa ttgggtccga gaattaacaa ttggtgtcca acaaaggta gctatggcaa ggatgtacta
   C A I K V R D A F S I V R N W S E E L T I G V Q Q R L A M A R M Y
2001 tcataaacc aagtttgcgt tgctcgacga atgtacatct gcagtagccc cagaaatgga acaaaggatg tacgaaaatg cgcaaaattt tggatatctg
   Y H K P K F A V L D E C T S A V A P E M E Q R M Y E N A Q N F G I S
2101 ttaatatcag ttgcccacag gacaagtta ttggcatttc ataactatct gttaaaattt gatggtaag gcggatacca atttggaccp ttaaccgga
   L I S V C H R T S L W H F H N Y L L K F D G K G G Y Q F G P F N P
2201 aggaagaggt atgtaatgaa gaaaaacttc ttgaactaaa tgccatcttg gatcaacagg tgccactttg ggagcggaag ttgaaagatc tgacaattgc
   K E R L C N E A E K L L E L N A I L D Q Q V P L W E R K L K D L T I
2301 taaagaatcc aacatcattc gtaaatcaga aactaacctg aatctttttg aaaagatcga agatccaaaa acgtccaaat ctaatgcatt gttaaatgca
   A K E S N I I R K S E T N L N L F E K I E D P K T S K S N A L F N A
2401 aataaaggcg agcgaatcac atcacctaca gggcaggaga ctagtaagag attaccacta ttttcccaac catctagttc agcatcatca aatttactaa
   N K G Q R I T S P T G Q E T S K R L P L F S Q P S S S A S S N L L
2501 gaaacaataa aagcttgtaac aaaaaagtta aaacaaaaa ggaagaagga aaggagaggt aa
   R N N K S L N K K V K T K K E E G K E R -

```

Abb. 50: Gen- und Proteinsequenz von Pxa2 (GenID: 853647). Bei Pxa2p handelt es sich um ein Protein mit 853 AS und einem Molekulargewicht von 97,1 kDa.

Homologievergleich

Die Proteinsequenzen von Pxa1p und Pxa2p wurden mit den vier humanen peroxisomalen ABC-Halbtransportern (ABCD1 - 4) und mit zwei gut charakterisierte ABC-Halbtransporter Vc MsbA und Sc Mdl1 verglichen. Der ClustalW Homologievergleich in Abb. 51 wurde mit dem Latex Makropaket TEXshade bearbeitet [7]. Das Homodimer Vc MsbA ist eine prokaryotische Lipid Flippase aus *Vibrio cholerae* [12]. Der mitochondriale ABC-Halbtransporter Mdl1 aus *S. cerevisiae* ist ebenfalls ein Heterodimer. Er ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und ist als Teil des Qualitätskontrollsystems für den Export von kurzen Peptiden aus der Matrix in den Intermembranraum zuständig. Von Mdl1 gibt es eine elektronenmikroskopische Struktur mit einer Auflösung von 23 Å [37]. Die Sequenzen beider ABC-Halbtransporter weisen deutliche Homologien zu den peroxisomalen ABC-Transportern auf (siehe Tab. 6). Die größte Sequenzhomologie findet sich in der C-terminalen nukleotidbindenden Domäne, hier finden sich hochkonservierte Bereiche wie die ABC-Signatur, die Walker A und die Walker B Domäne. Im Gegensatz dazu finden sich in der C-terminalen Transmembrandomäne außer dem EAA-ähnlichen Motiv kaum hochkonservierte Bereiche.

Die markierten Domänen stimmen bis auf geringfügige Verschiebungen mit Strukturvorhersagen aus der Literatur überein [37, 79, 98]. Die Strukturvorhersage für Pxa1p mit PredictProtein (URL: <http://cubic.bioc.columbia.edu>) [67] findet ebenfalls die Transmembrandomänen 1-5 und eine zusätzliche C-terminale Transmembrandomäne. Die sechste Transmembrandomäne wurde von keinem verwendeten Programm gefunden. Ähnlich ist das Ergebnis für Pxa2p, hier findet PredictProtein die Transmembrandomänen 1,2,4 und 5, die Domänen 3 und 6 wurden nicht erkannt. PredictProtein sagt keinerlei intramolekulare Disulfidbrücken in Pxa1p und Pxa2p voraus.

Sc Pxa1p	MSTTLAAPAKLKSLLNLHTHCIGLHVNDVTPKVYFKLLIRH	55
Sc Pxa2pMISTASAFYQKHRV	14
Hs ABCD1MPVLSRPRPWGN	13
Hs ABCD2MTHMLNAAADRVKTR	17
Hs ABCD3MAAFSKYLTARNS	13
Hs ABCD4	0
Vc MsaA	0
Sc Mdl1MIVRMIRLCKGPKLRS	17
Sc Pxa1p	LRRRAQILLVSLFLSGVTLSFGVTYSTFKIILKCYKFYKFPWKRNRNRP	110
Sc Pxa2p	NLLRSSYIILLLATLYNSNSSSSNNKTDKKDSESTVLENKKIEGKETAVDREED	69
Hs ABCD1	TLKRTAVLLALAAYG.....AHKVYPLVRQCL	40
Hs ABCD2	SAAKRAACLVAAYAA.....LKTLYPTIGKRL	44
Hs ABCD3	SLAGAAFLLLCLLHK.....RRRALGLHGKKS	40
Hs ABCD4	0
Vc MsaA	0
Sc Mdl1	QFASASALYSTKSLFKP.....PMYQKAEINIIIPHR	49
Sc Pxa1p	SQMQLDSGARIMYIPEVELVDRQSPDDNKFMNATDKKKRKRIFIPPKDNDVYEHD	165
Sc Pxa2p	ESSKEE.....LTIVSKH	82
Hs ABCD1	APARGLQ.....APAGEP.....	53
Hs ABCD2	KQSGHGK.....KKAAAYPAAEN	62
Hs ABCD3	GKPPLQN.....	47
Hs ABCD4	0
Vc MsaA	0
Sc Mdl1	KHFLLR.....IR	58
Sc Pxa1p	KFLFKNVELERAKNSQLFYSKFLNQMNVLISKILIPTVFDKNFLLLTAQIFFLVMR	220
Sc Pxa2p	STDSEDGAIIDKESKTNHKGGERKGVDFLFLKLLHDKKCLILFITQAILLNIR	137
Hs ABCD1TQEASGVAAAKAGMNRVFLQRLLWLLRLLFPRVLCRETGLLALHSAALVSR	104
Hs ABCD2	TEILHCTETICEKPSPGVNADFFKQLLELRKILFPKLVTTETGWLCLHSVALISR	117
Hs ABCD3NEKEGKKERAVVDKVFSSRLIQLKIMVPRTCKETGYLVLIAMLVSR	96
Hs ABCD4	..MAVAGPAPGAGARPRLDLQFLQRFLQILKVLFPSSWSSQNALMFLTLCLTLE	53
Vc MsaAMSLHSDSNWQTFKRLWTYIRLYKAGLVVSTIALVIN	37
Sc Mdl1	LQSDIAQGKKSTKPTLKLNSANSKSSGFKDIKRLFVLSKPESKYICLALLLILIS	113
Sc Pxa1p	TWLSLFLVAKLDGQIVKNIIAGRGRSFLWDLG.CWFLIAPVASYTNSAIKLLQQRKL	274
Sc Pxa2p	TLLSLRVATLDGQLVSTLVRAQYANFTKILLGKWMILGIPASFINSLISYTTKLC	192
Hs ABCD1	TFLSVYVARLDGRLARCIVRKDPRAFQWQLL.QWLLIALPATFVNSAIRYLEGQL	158
Hs ABCD2	TFLSIYVAGLDGKIVKSIVEKKPRTFIIKLI.KWLMIAIPATFVNSAIRYLECKL	171
Hs ABCD3	TYCDVWMIQNGTLIESGIIIGRSRKDFKRYLL.NFIAAMPLISLVNMFYGLNEL	150
Hs ABCD4	QFVIYQVGLIPSQYYGVLGNKDLEGFKTLTF.LAVMLIVLNSTLKSEFDQFTCNLL	107
Vc MsaA	AAADTYMISLLKPLLDGFGNAESNFLRILPFMILGLMFVRGLSGFASSYCLSWV	92
Sc Mdl1	SSVSMAPPSVIGKLLDLASESDGEDEEGSKSNKLYGFTKKQFFETALGAVFIIGAV	168
Sc Pxa1p	SLNFRVNLTRYIHDMYLDKRLTFYKLIFFDAKASNSVIKNIIDNSTINDVAKFCDAT	329
Sc Pxa2p	AVTINRKVSDFLLSKYLSNHHTFYSSVASESVS.....EIQDNLTKDIIYTFMNS	242
Hs ABCD1	ALSFRRSLVAHAYRLYFSQQTYYRVSNMMDGRLR.....NPDQSLTEDVVAFAASV	208
Hs ABCD2	ALAFRTRLVDHAYETYFTNQTYKVINMMDGRLA.....NPDQSLTEDIMMFSQSV	221
Hs ABCD3	KLCFRVRLTKYLYEEYLQAFTYYKMGNLDNRIA.....NPDQLLTQDVEKFCNSV	200
Hs ABCD4	YVSWRKDLTEHLHRLYFRGRAYTLLNVLRDDID.....NPDQRISQDVERFCRQL	157
Vc MsaA	SGNVVMQMRRLFNHFMHMPVRFFDQESTGGLLS.....RITYDSEQVAGAT	139
Sc Mdl1	ANASRIIILKVTGERLVARLRTRTMKAALDQDAT...FLDTRNVGDLISRLSSDA	220

	TM3	TM4	
Sc Pxa1p	CSVFANIAKPVIDLIFFSVYLRDNLGTVG.....VAGIFVNYFITGFILRKYTP		378
Sc Pxa2p	SLLLNQLLKPMLDLILCSFKLLTSNTSVMGEG...TLALGLIVYASNSLLKLIQP		294
Hs ABCD1	AHLYSNLTKPLLDVAVTSYTLRAARSRGAGTAWPSAIAGLVVFLTANVLRASF		263
Hs ABCD2	AHLYSNLTKPILDVMLTSYTLIQTATSRGASPIGPTLLAGLVVYATAKVLKACSP		276
Hs ABCD3	VDLYSNLSKPFLDIVLYIFKL TSAIGAQQP.....ASMMAVYLVVSGFLTRLR		249
Hs ABCD4	SSMASKLIISPFTLVYYTYQCFQSTGWLGP.....VSIFGYFILGTVVNKTLMG		206
Vc MsaA	SRALVSIVREGASIIIGLLTLMFWNSWQLS.....LVLIIVVAPVVAFAISFVSK		187
Sc Mdl1	SIVAKSVTQNVSDGTRAI IQGFVGF.....MMSFSLSWKLT CVMMLAP		264
	TM4		
Sc Pxa1p	PLGKLIGERSASDGDYYNYHLNMINSSEEIAFYQGTAVERTKV KELYDVLMEKML		433
Sc Pxa2p	NFTRLTMAASLESWFRSLHNSNSEEIALLRGQKRELENDVDSFYRLVLFIN		349
Hs ABCD1	KFGELVAEEAARRKGELRYMHSRVVANSEEIAFYGGHEVELALLQRSYQDLASQIN		318
Hs ABCD2	KFGKLVAEEAHRKGYLRVHSRIIANVSEEIAFYRGHKVEMKQLQKSYKALADQMN		331
Hs ABCD3	PIGKMTITEQKYEGEYRYVNSRLITNSSEEIAFYNGNKRERKQTVHSVFRKLVEHLH		304
Hs ABCD4	PIVMKLVHQEKLEGDFRFKHMQIRVNAEPAAFYRAGHVEHMRDTRRLQRLLQTQR		261
Vc MsaA	RFRKISRNMQTAMGHVTSSAEQMLKGHKVVL SYGGQVEERKRFDKVSNSMRQQTM		242
Sc Mdl1	PLGAMALIYGRKIRNLSRQLQTSVGLTKVAEEQLNATR TIQYGGKEKNEVRYA		319
	EAA-ähnliches Motiv		
	TM5		
Sc Pxa1p	LVDKV KFGYNMLEDYVLKYTW SGLGYVFASIPIVMSTLATGIN.....		476
Sc Pxa2p	REIKARAIYDVATAFVIKYTWGAAGLVLC SIPIFFKNKPSEDT.....LQ		394
Hs ABCD1	LILLERLWYVMLEQFLMKYVWSASGLLMVAVPIITATGYSESDAEAVKKALEKK		373
Hs ABCD2	LILSKRLWYIMIEQFLMKYVWS SGLIMVAIPITATGFADG.....EDGQ		377
Hs ABCD3	NFILFRFSMGFIDSIIAKYLATVVG YLVVSRPFLDLS.....HPRH		345
Hs ABCD4	ELMSKELWLYIGIN.TFDYLG SLSYVVIAPIPSGVYGDLS.....		303
Vc MsaA	KLVSAQSIA DPVIQMIASLALFAVLFLASVDSIRA.....		277
Sc Mdl1	KEVRNVFHHGLKEAVTSGLFFGSTGLVGN TAML SLLLVGTSMIQ.....		363
	TM6		
Sc Pxa1p	...SEEKNMKEFIVNKR LMLS LADAGSRLMHSIKDISQLTGYNRIFTLLSVLHR		528
Sc Pxa2p	LKEPGNDMTADFITNRRLLVTASSSIGRFVELKRNIQQLRGIRLRLNKFNDLLDA		449
Hs ABCD1	EEELVSE RTEAFTIARNLLTAAADAIERIMSSYKEVTELAGY TARVHEMFQVFED		428
Hs ABCD2	KQVMVSE RTEAFTTARNLLASGADAIERIMSSYKEVTELAGY TARVYNMFVVFDE		432
Hs ABCD3	LKSTHSELLEDY YQSGRM LRLMSQALGRIVLAGREMTRLAGFTARITBLMQVLKD		400
Hs ABCD4AELSTLVSKNAFVCIVLISCFTQLIDLSTT LSDVAGYTHRIGQLRETLLD		353
Vc MsaAELIPGTFITVVFSA MFGLMRPLKALTSVTSEFQRGMAACQTLFGLMDLETE		327
Sc Mdl1	...SGSMTVGELSSFFMMYAVYTGSSLFGLSSFYSEL MKGAGAAARVFELNDRKPL		415
Sc Pxa1p	VHSLNFNYGAVPSILSIRTEDASRNSNLLPTTDNSQDAIRGTIQRNFNGIRLENI		583
Sc Pxa2p	NKGDDEKE.....PRDERCIVEYD DSRIKFENI		477
Hs ABCD1	VQRCHFRR...PRELEDAQAGSGTIGRSGVRVEGPLKIRGQVVDVEQGIICENI		479
Hs ABCD2	VKRGYIKR...TAVIQESES HSKNGAKVELPLSDTLAIKGVVIDVDHGIICENV		483
Hs ABCD3	LNHGKYER...TMVSQKEK.....GIEGVQVIPLIPGAGEIIADNIIKFDHV		445
Hs ABCD4	MSLKSQD.....CEILGESEWGLDTPPGWPAAEPA DTAFLLERV		392
Vc MsaARDNGKYEAERVNCEVDVKDV		347
Sc Mdl1	IR.....PTIGKDPVSLAQKPIVFKNV		437
Sc Pxa1p	DVIIPSVRASEGIKLINKLTFQIPLHIDPITSKSN SIQDLSKANDIKLPFLQGSG		638
Sc Pxa2p	PLITPAN.....QVLVPELSEDLKHG		498
Hs ABCD1	PIVTPSG.....EVVVASLNIRVEEG		500
Hs ABCD2	PIITPAG.....EVVASRLNFKVEEG		504
Hs ABCD3	PLATPNG.....DVLIRDLNFEVRS		466
Hs ABCD4	SISAPSS.....DKPLIKDLSLKTSEG		414
Vc MsaA	TFTYQGK.....EKPALSHVSFSIPQG		369
Sc Mdl1	SFTYPTR.....PKHQIFKDLNITIKPG		460

Sc Pxa1p	SSLLILGPNGCGKSSIQRIIAETWPVYNK.....NGLLSIFSENNIFFIP	683
Sc Pxa2p	NHLLIIGPNGCGKSSLFRIILGGLWPIRATPNKNHQSCLIMPRRTVDRDCATFYLP	553
Hs ABCD1	MHLLITGPNGCGKSSLFRIILGGLWPTYG.....GVLYKPPPPQRMFYIP	543
Hs ABCD2	MHLLITGPNGCGKSSLFRIILSGLWPVYE.....GVLYKPPPPQRMFYIP	547
Hs ABCD3	ANVLICGPNGCGKSSLFRIILGGLWPLFG.....GRLTKPERGKLFYVP	509
Hs ABCD4	QSLLITGNTGTGKTSLLRVLGGLWTSTRGS.....VQMLTDFGPHGVFLFP	460
Vc MsbA	KTVALVGRSGSGKSTIANLFTFRFYDVS DSGS.....ICLDGHDVRDYKLTNLRR	417
Sc Mdl1	EHVCAVGPSGSGKSTIASLLRLRYDVSNSGIEFG.DEDIRNFNLKRYRRLTGYVQ	514

Walker A

Sc Pxa1p	QKPYFSRGGTLRDQTIYPMSSDEFFD....RGFRDKELVQILVEVKLDYLLKRG	733
Sc Pxa2p	QRPYMGNRSTFREQIYIPDSIEQFKERYHNDYDLGDADLIKILQLLDLEDLVTEN	608
Hs ABCD1	QRPYMSVG.SLRDQVIYIPDSVEDMQR....KGYSEQDLEAILDVVHLHHILQR.	591
Hs ABCD2	QRPYMSLG.SLRDQVIYIPDSVDDMHD....KGYTDQDLERILHNVLHYHIVQR.	595
Hs ABCD3	QRPYMTLG.TLRDQVIYIPDGRDQKR....KGISDLVLKEYLDNVQLGHILER.	557
Hs ABCD4	QKPFFTDG.TLREQVIYPLKEVYPDS....GSADDERILRFLLEAGLSNLVAR.	508
Vc MsbA	HFALVSQNVHLFNDTIANNIAYAAEG.....EYTREQIEQAARQAHA MBFIENM	466
Sc Mdl1	QEPLLFNG.TILDNLYCIPPEIAEQ.....DDRIRRAIGKANCTKFLANF	559

Q-loop

Sc Pxa1p	V.....GLTYLDAIADWKDILSGGEEKQRVNFA	760
Sc Pxa2p	MSLLLAQRTSKNDSQQLSTEDNQSPCAIKVRDAFSIVRNWSEELTIGVQQRLAMA	663
Hs ABCD1EGGW EAMCDWKDVLSGGEEKQRI GMA	616
Hs ABCD2EGGWDAVMDWKDVLSGGEEKQRM GMA	620
Hs ABCD3EGGWDSVQDWM DVLSGGEEKQRMAMA	582
Hs ABCD4	T.....EGLDQQVDWNWYDVLSPGEMQRLSFA	535
Vc MsbA	P.....QGLD TVIGENGTSLSGGQQRQVAIA	492
Sc Mdl1	P.....DGLQTMVGARGAQLSGGQKQRIALA	585

ABC Signatur

Sc Pxa1p	RIMFHKPLYVVLDEATNAISVDMEDYLFNLLKR...YRFNFISISQRFTLIKYHE	812
Sc Pxa2p	RMYYHKKPKFAVLDECTSAVAPEMEQRM YENAQN...FGISLISVCHRFSLWHFHN	715
Hs ABCD1	RMFYHRPKYALLDECTSAVSIDVEGKIFQA AKD...AGIALLSITHRPSLWKYHT	668
Hs ABCD2	RMFYHKKPKYALLDECTSAVSIDVEGKIFQA AKG...AGISLLSITHRPSLWKYHT	672
Hs ABCD3	RLFYHKKPQFAILDECTSAVSVDVEGYIYSHCRK...VGITLFTVSHRKS LWKHHE	634
Hs ABCD4	RLFYHKKPKYAVLDEATSALTEVESELYRIGQQ...LGMTFISVGHRSLEKPHS	587
Vc MsbA	RALLRDAPVLILDEATSALDTESERAIQAALDELQ.KNKTVLVIAHRLSTIEQAD	546
Sc Mdl1	RAFLLDPAVLILDEATSALDSQSEIIVAKNLQRRVERGFTTISTIAHRLSTIKHST	640

ABC Signatur

Walker B

H-Loop

Sc Pxa1p	MLEIIGENRDGKWQLQAVGTDEAITSIDNEIEELERKLERVKGWEDERTKIREKL	867
Sc Pxa2p	YLLKFDGKGGYQFGPFNPKERLCNEEKLELNAILDQQVPLWERKLDLTAKES	770
Hs ABCD1	HLLQFDGEGGWKFEKLD SAARLSLTEEKQRLLEQQLAGIPKMQRRLQELCQILGEA	723
Hs ABCD2	HLLQFDGEGGWRFELDTAIRLTLSEEKQKLESQLAGIPKMQRRLNELCKILGED	727
Hs ABCD3	YYLHMDGRGNIEFKQITEDTVEFGS.....	659
Hs ABCD4	LVLKLCGGGRWELMRIKVE.....	606
Vc MsbA	EILVVDGEIEIERGRHADLLAQDGAYAQLHRIQFGE.....	582
Sc Mdl1	RVIVLGKHGSVVETGSFRDLIAIPNSELNALAEQQDEEGKGGVIDLDNSVAREV	695

Sc Pxa1p	EII.....	870
Sc Pxa2p	NIIRKSETNLNLFEKIEDPKTSKSNALFNANKGQRITSPTGQETSKRLPLFSQPS	825
Hs ABCD1	VAPAHVPAPSPQGPGLQGA ST.....	745
Hs ABCD2	SVLKTIKNEDETS.....	740
Hs ABCD3	659
Hs ABCD4	606
Vc MsbA	582
Sc Mdl1	695

Sc Pxa1p	870
Sc Pxa2p	SSASSNLLRNNKSLNKKVTKKEEGKER	853
Hs ABCD1	745
Hs ABCD2	740
Hs ABCD3	659
Hs ABCD4	606
Vc MsbA	582
Sc Mdl1	695





 negativ geladen (—)
 positiv geladen (+)
 polar ungeladen
 hydrophob unpolar

Abb. 51: Multiples ClustalW Aminosäuresequenzalignment und Domänenstruktur. Das Alignment zeigt die beiden peroxisomalen ABC-Halbtransporter aus *S. cerevisiae* Pxa1p (Swiss-Prot Eintrag P41909) und Pxa2p (P34230), die vier homologen humanen ABC-Halbtransporter ABCD1 (Trivialname: ALDP; P33897), ABCD2 (Trivialname: ALDRP; Q9UBJ2), ABCD3 (Trivialname: PMP70; P28288) und ABCD4 (Trivialname: PMP69; Q6IAQ0) und zwei gut charakterisierte ABC-Halbtransporter MsbA aus *V. cholerae* (Q9KQW9) und Mdl1 aus *S. cerevisiae* (P33310).

Tab. 6: Homologiegrad zwischen den verglichenen ABC-Transportern (Daten aus PredictProtein PSI-Blast)

Homologie zu Pxa1p

	Sequenzlänge	Paarweise Übereinstimmung (%)	Homologe Amino- säuren (%)	Anzahl verglicher Aminosäuren
Sc Pxa1	758	100	100	758
Sc Pxa2	853	21	40	679
Hs ABCD1	745	30	49	639
Hs ABCD2	740	32	51	638
Hs ABCD3	659	27	48	613
Hs ABCD4	606	21	40	584
Sc Mdl1	695	14	30	603
Vc MsbA	582	12	27	506

Homologie zu Pxa2p

	Sequenzlänge	Paarweise Übereinstimmung (%)	Homologe Amino- säuren (%)	Anzahl verglicher Aminosäuren
Sc Pxa1	758	21	40	661
Sc Pxa2	853	100	100	853
Hs ABCD1	745	28	48	611
Hs ABCD2	740	30	49	618
Hs ABCD3	659	25	44	605
Hs ABCD4	606	21	37	566
Sc Mdl1	695	14	31	615
Vc MsbA	582	11	28	569

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung einer großen Anzahl von Menschen, denen ich meinen Dank aussprechen möchte.

Zuerst möchte ich Prof. Thomas Pomorski danken für die Einführung in das interessante Feld der Transportprozesse an Biomembranen, und dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in diesem höchst innovativen Gebiet zu arbeiten. Seine gute Betreuung und Unterstützung, verbunden mit einer großen Offenheit bewirkten ein angenehmes und fruchtbares Arbeitsumfeld.

Prof. Andreas Herrmann möchte ich vor allem danken für die gute Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe und so manchen hilfreichen Hinweis. Sein lebendiges Engagement prägt den Geist der Arbeitsgruppe und ist Triebfeder für die vielen erfolgreichen Projekte. Durch die Integration in das von ihm initiierte europäische Flippase-Netzwerk, bekam ich die Möglichkeit internationale Kontakte zu knüpfen und meine Arbeit einem größeren Auditorium zur Diskussion zu stellen.

Bei Prof. Hanspeter Rottensteiner und Michael Schneider von der Ruhr-Universität Bochum möchte ich mich für die gute und herzliche Zusammenarbeit in unserem gemeinsamen DFG-Projekt bedanken. Alle Hefestämme und Expressionsplasmide, die in dieser Arbeit verwendet wurden stammen von ihnen.

Dr. Anne-Katrin Windeck danke ich für die Synthese von SL-Oleoyl-CoA, dieses käuflich nicht erhältliche Analogon der Ölsäure bildete die Grundlage für die vorgestellten Transportexperimente. Außerdem danke ich ihr für die nette Zusammenarbeit.

Dr. Peter Müller danke ich für die Einführung in die ESR-Spektroskopie, die Hilfe bei der Spektreninterpretation und für seine freundliche Art, mit der er mir stets bei experimentellen Problemen zu Seite stand.

Bei Prof. Holzhütter möchte ich mich für die Unterstützung bei der Dateninterpretation der azido-ATP Bindungsexperimente bedanken.

Die Vorversuche mit Oleoyl-CoA in GUVs wurden von Lara Kutschenko durchgeführt, ich möchte mich bei ihr für die schönen Abbildungen bedanken.

Bei Sabine Schiller, Ursula Muschick, Bärbel Hillebrecht und Gudrun Habermann möchte ich mich für die tatkräftige und freundliche Unterstützung im Laboralltag bedanken.

Der ganzen Arbeitsgruppe „Molekulare- und Zelluläre Biophysik“ möchte ich für die kreative und familiäre Atmosphäre danken. Speziell den „Mädels“ Patricia, Silvia, Anna-Pia und Adrien in unserem Denkerstübchen, in dem es immer sehr lustig war, und Dr. Juha Okkeri für viele praktische Tipps in einem ausgezeichneten Englisch, das es mir ermöglichte, mein Konversationsenglisch zu trainieren.

Bei Cosima Stromer möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass sie sich als Geisteswissenschaftlerin beim Korrekturlesen durch mehr als 100 Seiten naturwissenschaftliche Terminologie gekämpft hat.

Meinem Freund Oli danke ich für seine Geduld und Unterstützung, nicht nur in der Endphase der Promotion.

Ich danke der deutschen Forschungsgesellschaft für die Finanzierung des Projektes, die diese Arbeit erst möglich gemacht hat.

Publikationen

Vorträge

„Role of Peroxisomal ABC-Transporters in Fatty-Acid Transport“ Flippase Sattelite Meeting im Rahmen des FEBS Special Meeting: ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck, 04.03.2006.

„Functional significance of peroxisomal ABC transporters in long-chain fatty acid transport“ Annual and Mid-Term Meeting RTN Network „Flippases“, Royal Veterinay Agricultural University Kopenhagen, 24.-26.08.2006.

Poster

Gabriele Schreiber, Anne-Katrin Windeck, Michael Schneider, Hanspeter Rottensteiner und Thomas Pomorski (2006): Synthesis of a spin-labeled oleoyl-CoA derivate to study the functional significance of peroxisomal ABC transporters in fatty acid transport, FEBS Special Meeting: ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck.

Gabriele Schreiber, Anne-Katrin Windeck, Michael Schneider, Hanspeter Rottensteiner und Thomas Pomorski (2006): Synthesis of a spin-labeled oleoyl-CoA derivate to study the functional significance of peroxisomal ABC transporters in fatty acid transport, 1st International Workshop on Expression, Function and Structure of Membrane Proteins, Florenz.

Manuskript in Vorbereitung

Schreiber Gabriele, Schneider Michael, Rottensteiner Hanspeter und Pomorski Thomas: Charakterisation of the nucleotide binding properties of purified peroxisomal ABC-transporter Pxa1p-Pxa2p from *Saccharomyces cerevisiae*.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe verfasst zu haben und nur die angegebene Literatur verwendet zu haben. Die Arbeit wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hanspeter Rottensteiner (Ruhr-Universität Bochum) durchgeführt. Ergebnisse und Materialien der Bochumer Arbeitsgruppe wurden entsprechend gekennzeichnet.

Ich besitze keinen entsprechenden Doktorgrad und habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben.

Die dem Promotionsverfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Gabriele Schreiber